

Recherches sur les Désaminations des Acides Aminés

ÉTUDE CHIMIQUE

Application aux dosages dans les milieux Biologiques

THÈSE

*présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
de Montpellier, le 18 Juillet 1952, par*

Pierre CRISTOL,

né le 14 Juillet 1927, à ASPIRAN (Hérault)

pour obtenir le grade de « DOCTEUR EN MÉDECINE »

Examineurs
de la thèse

MM. L. HEDON, professeur, Président.
L. PECH, professeur.
G. GIRAUD, professeur, Doyen.
C. BÉNÉZECH, agrégé.

Assesseurs

IMPRIMERIE
CAUSSE, GRAILLE & CASTELNAU
7, rue Dom-Vaissette
MONTPELLIER

1953

Recherches sur les Désaminations
des Acides Aminés
ÉTUDE CHIMIQUE
Application aux dosages
dans les milieux Biologiques

THÈSE

*présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine
de Montpellier, le 18 Juillet 1952, par*

Pierre CRISTOL,

né le 14 Juillet 1927, à ASPIRAN (Hérault)

pour obtenir le grade de « DOCTEUR EN MÉDECINE »

Examinateurs de la thèse	{	MM. L. HEDON, professeur, Président.	{	Assesseurs
		L. PECH, professeur.		
		G. GIRAUD, professeur, Doyen.		
		C. BÉNÉZECH, agrégé.		

IMPRIMERIE
CAUSSE, GRAILLE & CASTELNAU
7, rue Dom-Vaissette
MONTPELLIER

1953



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Professeurs

Cahires : MM.

Anatomie LAUX
 Histologie TURCHINI
 Physiologie HÉDON
 Physiol. appliq. . LOUBATIÈRES
 Chimie biol. méd.
 et toxicol. CRISTOL
 Physique méd. . . PECH
 Anat. path. et
 méd. expér. ... BAUMEL
 Microbiologie ... CARRÈRE
 Hist. nat. méd.
 par. et méd. exo. HARANT
 Path. et thér. gén. PAGÈS
 Thér. et clin. des
 mal. infect. JANBON
 Hydrol. thér. et
 climat. BERT
 Hygiène CARRIEU
 Méd. lég. et méd.
 soc. FOURCADE
 Tech. opér. et
 chir. expér. ... LAPEYRIE
 Path. et clin. prop
 chir. MOURGUE-MOLINES
 Path. et clin.
 prop. méd. PUECH
 Clinique méd. .. GIRAUD, *doyen*

Clinique méd. .. BOULET
 Clinique chir. ... LAPEYRIE
 Clinique chir. ... AIMES
 Clin. obstétricale . CADERAS DE KERLEAU
 Clin. des mal.
 ment. et nerv... LAFON
 Clin. des mal. des
 enf. et hyg. du
 1^{er} âge CHAPTAL
 Clin. de dermato-
 syphilig. MARGAROT
 Clin. chir. et inf.
 et orth. ÉTIENNE
 Clin. urologique . TRUC
 Clin. gynéc. ROUX
 Clin. ophtalm. .. DEJEAN
 Clin. d'oto-rhino-
 lar. et chir. max-
 faciale TERRACOL
 Clin. de la tub. . VIDAL
 Electro-radiologie LAMARQUE

Professorat à titre personnel :

Histol. et emb. . GRANEL

Chargé de cours :

Prop. méd. P. RIMBAUD

Professeurs honoraires

MM. GALAVIELLE, VIRES, VILLARD, GRYNFELTT, RICHE, L. RIMBAUD,
 BOUDET, EUZIÈRE, J. DELMAS.

Chargés d'enseignements complémentaires

MM.

Chimie BÉNÉZECH,
m. de c. agr.
 Anatomie pathol. . CAZAL, *agrégé.*
 Pharmacologie .. HARANT, *prof.*
 Pharm. et thér. ... SERRE, *agrégé.*
 Pathol. expérim. PASSOUANT,
m. de c. agr.
 Thérapeutique .. PASSOUANT,
m. de c. agr.
 Pathol. médicale . BOUCOMONT, *ag. libre.*
 — — SERRE, *agrégé.*

MM.

Path. respiratoire BALMÈS, *agrégé.*
 Neuro-chirurgie . GROS, *agrégé.*
 Chir. de la tub. .. MOURGUE-MOLINES,
professeur.
 Clin. gast-ent. ... BAUMEL, *prof.*
 Pathologie chir. . JOYEUX, *agrégé.*
 — — NÈGRE, *agrégé.*
 Obstétrique COLL DE CARRERA,
agrégé libre.

Maitres de conférences et agrégés en exercice

MM.

Chimie BÉNÉZECH,
m. de c. agr.
 Microbiologie ... RENOUX, *m. de c. agr.*
 Médecine SERRE.
 — BALMÈS.

MM.

Médecine CAZAL, *m. de c. agr.*
 Médecine expér... PASSOUANT, *m. de c. ag.*
 Chirurgie JOYEUX.
 — NÈGRE.
 Neuro-chirurgie . GROS.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MON PÈRE

le professeur Paul CRISTOL.

A MA MÈRE

A TOUS LES DOCTEURS DE MA FAMILLE

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le professeur L. HEDON

Officier de la Légion d'Honneur

*qui a reporté sur moi l'affection
que son père avait pour le mien.*

à Monsieur le professeur J. L. PECH

Chevalier de la Légion d'Honneur

*en remerciement pour ses conseils
et sa sollicitude.*

à Monsieur le doyen G. GIRAUD

Officier de la Légion d'Honneur

en témoignage de respect et de reconnaissance.

à Monsieur le professeur agrégé BÉNÉZECH

Croix de Guerre 39

*maître admirable et véritable ami
de tous ses élèves.*

AVANT-PROPOS

Bien qu'encore incomplets, les travaux sur les désaminations poursuivis depuis déjà plusieurs années au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Montpellier, nous ont cependant fourni jusqu'à ce jour des résultats assez intéressants pour justifier ce travail de fin d'étude.

Nous essayerons, chemin faisant, non plus, comme il a déjà été fait dans des publications antérieures, de considérer chaque cas particulier de désamination, mais d'envisager le problème dans son ensemble.

C'est donc une véritable mise au point sur les données actuelles que nous présentons.

Bien qu'ayant accompli une large part du labeur expérimental nous ne serions jamais parvenu en si peu de temps à un tel résultat sans la collaboration étroite et l'aide considérable que nous avons reçu de la part de nos camarades de laboratoire.

Nous remercions tout d'abord Serge LISSITZKI à qui nous devons l'étude des désaminations par l'acide nitreux et Jacques LLORY dont le nom est intimément mêlé aux publications sur la chloramine et la ninhydrine.

Nous remercions ensuite Jean CORBIÈRES dont les résultats figurent dans le chapitre sur l'influence respective de la concentration en azote aminé de la prise d'essai et des désalbuminants.

Nous remercions à nouveau Monsieur le professeur agrégé BÉNÉZECH dont la grande patience et l'esprit de synthèse nous permettent aujourd'hui de présenter ce travail.

RECHERCHES SUR LES DÉSAMINATIONS DES ACIDES AMINÉS. ÉTUDE CHIMIQUE. APPLICATIONS AUX DOSAGES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

par M. Pierre CRISTOL

INTRODUCTION

On sait que, pour les acides aminés, il existe quatre modes théoriquement possibles de désamination :

1^o Le mode de désamination réductrice avec obtention d'acides gras normaux ;

2^o Le mode de désamination hydrolytique avec obtention d'acides gras α -hydroxylés ;

3^o Le mode de désamination oxydative avec obtention d'acides α -cétoniques ;

4^o Le mode de désamination désaturante avec obtention d'acides gras α -désaturés.

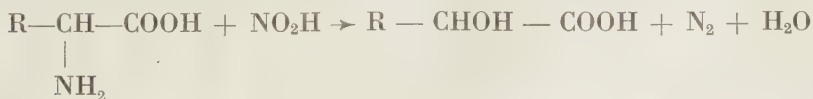
Dans tous ces cas, il y a évidemment mise en liberté d'une molécule d'ammoniac.

Ces divers modes de désamination existent chez les êtres vivants, aussi bien chez les microbes et les levures que chez les animaux ou végétaux supérieurs ; il semble donc possible, par ces réactions biochimiques, de doser l'azote α -aminé. En réalité, la question est plus complexe car les réactions ne s'arrêtent pas là et quelquefois on ne peut pas mettre d'ammoniac en évidence.

Notre intention n'est pas d'étudier ces désaminations produites par les êtres vivants ou leurs diastases, mais de rechercher comment on peut arriver au même résultat par des moyens purement chimiques. En somme, nous allons étudier les procédés permettant d'obtenir la libération de l'ammoniac virtuellement contenu dans les acides aminés.

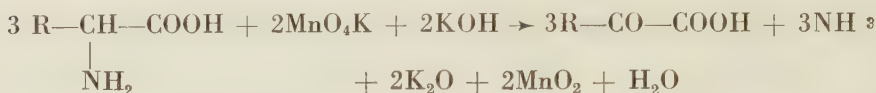
Dans cet ordre d'idées, trois types de désaminations peuvent être retenus :

1^o Le type de désamination hydrolytique effectuée par l'acide nitreux selon la réaction schématisée :



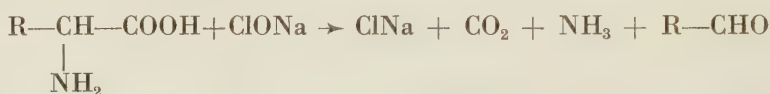
C'est le principe de la méthode classique de D.D. VAN SLYKE.

2° Le type de désamination oxydative par une solution alcaline de permanganate de potassium selon la réaction :



3° Le type de désamination oxydative couplée avec une décarboxylation réalisée :

soit par la chloramine T en milieu alcalin selon la réaction schématique dont nous reparlerons .



soit par la ninhydrine selon la réaction globale :



Telles sont les réactions que nous avons étudiées depuis trois ans du point de vue physico-chimique et de leurs applications à la biochimie clinique.

D'autres réactions sont à l'étude et feront l'objet, nous l'espérons, de travaux ultérieurs.

CHAPITRE PREMIER

DÉSAMINATION HYDROLYTIQUE PAR L'ACIDE NITREUX

a) Conditions expérimentales

Nous ne croyons pas utile de reproduire le mode opératoire de cette méthode qui se trouve dans tous les traités classiques, nous donnons simplement quelques précisions indiquées par les travaux de Paul CRISTOL, C. BÉNÉZEC et S. LISSITZKY [1].

L'appareillage utilisé est le dispositif classique de VAN SLYKE avec lequel nous avons essayé d'obtenir le minimum d'erreur moyennant un certain nombre de précautions.

I. *Les réactifs.*

Ils doivent être :

- aussi purs que possible ;
- employés en quantité exactement mesurée ;
- utilisés à la même température.

La pureté du nitrite de soude est de première importance. Le nitrite de sodium R.P. nous a donné toute satisfaction ; sa solution aqueuse doit être récemment préparée. Il faut néanmoins tenir compte de la dissolution endothermique de ce produit et ramener avant chaque série de mesures la solution à la température de l'expérience.

Les solutions d'acides aminés doivent être récentes et leur teneur en azote aminé doublement contrôlée par un dosage d'azote total et une formol titration.

Quant à la solution absorbante de permanganate de potassium alcalin, il suffit de la renouveler assez fréquemment, nécessité dont on se rend compte au moyen d'essais à blanc.

II. *L'appareil.*

Nous avons rendu aussi constantes que possible les conditions d'utilisation de l'appareil de VAN SLYKE et en particulier la vitesse de rotation du moteur qui règle l'agitation de la chambre à réaction ; ce point est très important lorsqu'il s'agit de suivre la cinétique de la réaction pendant des temps d'agitations variables.

III. *Évaluation des résultats.*

Le gazomètre de l'appareil de VAN SLYKE, gradué en centièmes de cm^3 permet de mesurer le volume dégagé dans les conditions de l'expé-

rience, c'est-à-dire à une température et à une pression déterminées. Les tables de VAN SLYKE permettent d'en déduire le poids d'azote correspondant.

b) Étude cinétique de la réaction

I. Détermination de la constante de vitesse.

La désamination des acides aminés par l'acide nitreux, s'effectuant en présence d'un gros excès de réactif, se comporte comme une réaction mono-moléculaire irréversible dont la constante de vitesse est donnée par l'expression :

$$K_v = \frac{2,3}{t} \times \log \frac{1}{1-x}$$

x étant le poids d'azote aminé en mg obtenu au bout d'un temps t de réaction (la prise d'essai théorique étant toujours de 1 mg d'azote aminé).

Nous avons calculé la constante de vitesse à 16° en appliquant la relation ci-dessous déduite de la formule de correction de température de VAN SLYKE.

$$\text{Log } K_{16} = \text{Log } K - 0,03 (\theta - 16)$$

K étant la constante mesurée à la température θ .

Remarquons que les constantes de vitesse de désamination calculées à partir des mesures effectuées avec l'appareil de Van Slyke utilisé ne peuvent avoir de valeur absolue ; elles dépendent essentiellement des caractéristiques de l'appareil. Par contre, la valeur relative de ces constantes par rapport à un acide aminé pris comme référence nous indiquera, et cela quelles que soient les conditions expérimentales, comment se comporte la désamination d'un acide aminé.

II. Comportement individuel des acides aminés.

Le tableau I indique nos résultats ; dans la première colonne figurent les constantes calculées à partir de dosages effectués ; dans la deuxième colonne figurent les constantes relatives calculées par rapport à celle de l'alanine. Cet acide aminé a été choisi car son radical $R = CH_3$ contenu dans la formule générale $R - CH - COOH$ est le radical organique le plus simple.



Cette remarque n'entache en rien les raisonnements effectués par la suite sur les constantes directement calculées puisque les unes sont égales aux autres affectées d'un coefficient constant $\frac{1}{1,09}$ (1,09 étant la constante mesurée pour l'alanine).

TABLEAU I

		K v mesurée	K v par rapport à l'alanine
Mono-amino- Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	0,78	0,71
	Alanine	1,09	1,00
	Acide α -amino butyrique	0,96	0,88
	Norvaline	0,88	0,81
	Norleucine	0,80	0,73
Mono-amino- Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	0,79	0,72
	Leucine	1,04	0,95
	Isoleucine	0,85	0,78
Mono-amino- Mono-acides Hydroxylés et soufrés	Sérine	1,19	1,09
	Cystéine	1,71	1,57
	Cystine	3,40	3,12
	Méthionine	0,84	0,77
	Taurine	3,79	3,48
	Acide cystéique	∞	∞
Mono-amino- Diacides	Acide aspartique	1,73	1,59
	Acide glutamique	1,02	0,93
Acides diaminés	Ornithine	0,54	0,49
		0,40	0,36
	Lysine	0,37	0,34
		0,23	0,21
Acides α -aminés α -substitués	Isovaline	0,15	0,14
	Acide α -amino isobutyrique	0,33	0,30
Acides β et ω aminés	β -alanine	0,90	0,82
	Acide β -amino butyrique	0,59	0,54
	Acide ε -amino caproïque	0,22	0,20
Acides aminés cycliques	Phényl-glycine	0,78	0,71
	Phényl-alanine	0,96	0,88
	Tyrosine	0,67	0,63
	Histidine	0,94	0,86
	Proline	0	0
	Tryptophane	0,70	0,63
Acides aminés aromatiques halogénés	Diidotyrosine	1,36	1,28
	Mono bromotyrosine	0,79	0,72
	Dibromo-tyrosine	1,25	1,15
	Mono-iodo-histidine	1,38	1,27
	Di-iodo-histidine	1,71	1,57

1° *Mono-amino mono-acides aliphatiques à chaîne linéaire.*

Le tableau I nous montre que, le glyocolle mis à part, les constantes de vitesse sont inversement proportionnelles aux poids moléculaires des acides aminés ; on peut donc écrire :

$$K_v \times P.m = Cte = K'.$$

On obtient en effet les valeurs numériques suivantes :

	K_v	$P.m$	K'
Alanine	1.09	89	$1.09 \times 89 = 97$
Acide α -aminobutyrique	0.96	103	$0.96 \times 103 = 98$
Norvaline	0.88	117	$0.88 \times 117 = 102$
Norleucine	0.80	131	$0.80 \times 131 = 104$

Le glyocolle fait exception à la règle ce qui tient au fait que dans sa constitution le radical R est uniquement constitué par H.

2° *Mono-amino mono-acides aliphatiques à chaîne ramifiée.*

On voit sur le tableau I que :

- a) K_v valine est du même ordre que K_v glyocolle.
- b) K_v leucine est du même ordre que K_v alanine.
- c) K_v isoleucine se rapproche sensiblement de K_v norvaline.

Les relations a) et b) s'expliquent aisément par l'action oxydante de l'acide nitreux sur les groupements isopropyl de la valine et de la leucine selon les réactions :



Cette hypothèse est vérifiée par la mise en évidence qualitative et quantitative de l'acétone dans les produits de réaction : elle est, de plus, conforme aux travaux de FROMAGEOT et HEITZ [2] sur la formation d'acétone par oxydation chromique des produits de désamination de ces acides aminés.

Quant à l'isoleucine, on peut admettre que la désamination oxydative la transforme en norvaline : nous n'avons pas encore la preuve formelle de la vérité de cette hypothèse.

3° *Mono-amino-diacides.*

Les constantes de vitesse de désamination des acides aspartique et glutamique sont beaucoup plus fortes que celles des mono-amino-mono-acides correspondants (acide α -aminobutyrique et norvaline).

On interprète ces divergences en faisant intervenir la physionomie particulière de la molécule, objectivée par la constante de dissociation du second carboxyle et on pose dans ces conditions :

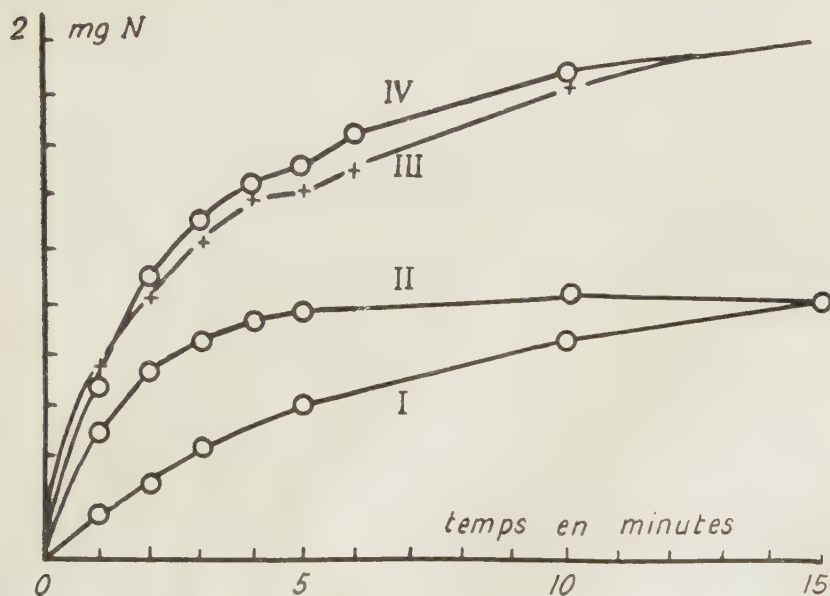
$$K_v = K' \frac{[\text{COOH} (2)]}{P_m}$$

avec pour K' les valeurs ci-dessous :

	K_v	$[\text{COOH} (2)]$	P_m	K'
Acide aspartique	1,73	$1,35 \times 10^{-4}$	133	$170,2 \times 10^4$
Acide glutamique	1,02	$0,87 \times 10^{-4}$	147	$171,9 \times 10^4$

4° Acides diaminés.

Les courbes de désamination de l'ornithine et de la lysine (pourcentage d'azote aminé libéré en fonction du temps) présentent l'une et l'autre un plateau entre la 4^{me} et la 5^{me} minute de sorte que l'on peut en déduire deux constantes de vitesse correspondant aux deux branches de courbe (graphique I).



GRAPHIQUE I

Courbe I : Acide ϵ -aminocaproïque
 Courbe II : Norleucine
 Courbe III : Lysine
 Courbe IV : Somme : acide ϵ -aminocaproïque + Norleucine.

On remarque ainsi, dans le cas de la lysine par exemple, que la constante de vitesse de désamination correspondant à la seconde branche de courbe (0,23) est pratiquement égale à celle de l'acide ε -amino caproïque (0,22) c'est-à-dire que cette seconde branche représente la désamination du NH_2 en ω de la lysine,

Le graphique I montre qu'on obtient pratiquement la courbe de désamination de la lysine en ajoutant pour chaque temps les quantités d'azote obtenues avec la norleucine et l'acide ε -amino caproïque.

On constate ainsi que l' ω - NH_2 de la lysine se désamine plus lentement que l' α - NH_2 . Cela revient à dire que la désamination de la lysine donne un volume d'azote dans lequel interviennent chacun avec sa vitesse propre les deux groupements NH_2 . Tout se passe comme si chacun d'eux était désaminé séparément comme le montre le tableau II ci-dessous qui permet de voir à chaque instant la part respective de chacun des deux NH_2 dans la désamination totale.

Les nombres figurant sur le tableau II expriment en mg le poids d'azote aminé fourni par la désamination ; les prises d'essai d'azote sont de 1 mg pour la norleucine et l'acide ε -amino caproïque et de 2 mg pour la lysine.

TABEAU II

	Norleucine	Acide ε -amino- caproïque	Somme	Lysine
t = 1'	0,485	0,17	0,65	0,73
t = 2'	0,73	0,31	1,04	0,93
t = 3'	0,86	0,43	1,29	1,16
t = 4'	0,93	0,47	1,40	1,39
t = 5'	0,96	0,61	1,57	1,41
t = 6'	0,98	0,68	1,66	1,52
t = 10'	1,0	0,85	1,85	1,83
t = 15'	1,0	0,98	1,98	2,0

2° Influence de la position du NH_2 par rapport au COOH .

En principe, plus le radical NH_2 est éloigné du carboxyle, plus la vitesse de désamination est lente. Tout se passe comme si le voisinage du COOH exalte la labilité du groupement aminé. Cela est d'ailleurs en parfait accord avec les résultats concernant les acides aminés dicarboxyliques.

Voici deux exemples :

β -alanine : $K_v = 0,90$

α -alanine : $K_v = 1,09$

$$\text{Rapport } \frac{\beta}{\alpha} = \frac{0,90}{1,09} = 0,82$$

Acide ε -amino-caproïque : $K_v = 0,22$

Norleucine (acide α -amino-caproïque : $K_v = 0,80$

$$\text{Rapport } \frac{\varepsilon}{\alpha} = \frac{0,22}{0,80} = 0,27$$

Ces résultats sont conformes aux travaux de DUNN et SCHMIDT [3].

6° Mono-acides α -aminés α -substitués.

La substitution d'un radical CH_3 sur le carbone portant NH et COOH ralentit considérablement la vitesse de désamination.

On peut voir par exemple que la constante de vitesse de l'acide α -aminoisobutyrique est de 0,33 alors que celle de l'acide- α -amino butyrique est de 0,96.

De même, celle de l'isovaline est égale à 0,15 alors que celle de la norvaline est égale à 0,88.

Ces résultats permettent d'expliquer les expériences de M. POLO-NOVSKI et BOULANGER [4] montrant que les acides α -amino α -méthyl propanoïque (acide α -aminoisobutyrique) et α -amino- α -méthyl butanoïque (isovaline) sont pratiquement inutilisables pour l'organisme.

7° Acides aminés soufrés et hydroxylés.

La présence dans ces composés d'un groupement polaire électro-actif (OH ; SH ; S-S ; $\text{CH}_3\text{-S}$; SO_3H) leur donnant des propriétés spéciales empêche de leur appliquer la loi simple énoncée dans le cas des mono-peptides aliphatiques à chaîne linéaire.

Il nous a paru logique de faire intervenir, pour interpréter leur constante de vitesse de désamination, l'effet de ces groupements sur la constante de dissociation du carboxyle.

On remarque alors que K_v est à la fois inversement proportionnel au poids moléculaire de l'acide aminé et proportionnel à la constante de dissociation du carboxyle.

$$K_v = K' \times \frac{[\text{COOH}]}{P_m}$$

On trouve pour K' les valeurs suivantes :

	K_v	$[\text{COOH}]$	P_m	K'
Alanine	1,09	$0,6 \times 10^{-2}$	89	$15,7 \times 10^3$
Sérine	1,19	$0,8 \times 10^{-2}$	105	$16,0 \times 10^3$
Méthionine	0,84	$0,7 \times 10^{-2}$	149	$18,6 \times 10^3$
Cystine	3,40	$4,1 \times 10^{-2}$	240	$20,5 \times 10^3$
Cystéine	1,71	$2,5 \times 10^{-2}$	121	$8,3 \times 10^3$
Taurine	3,79	$3,16 \times 10^{-2}$	125	$15,0 \times 10^3$
Acide cystéique	∞			

On voit qu'à l'exception de la cystéine l'expression K' est pratiquement constante. Le cas de la cystéine paraît aberrant ; si, par contre, on ajoute au milieu de l'iode en quantité exactement calculée pour oxyder les groupements SH, on retombe sur la constante de vitesse de la cystine (3,49) aux erreurs d'expérience près.

D'autre part, si l'on compare la cystéine, la taurine et l'acide cystéique dont on connaît les relations chimiques, on constate, que la vitesse de désamination est d'autant plus grande que le caractère acide de la molécule est plus net ; c'est ainsi en particulier que la désamination de l'acide cystéique est pratiquement instantanée et par conséquent la constante de vitesse impossible à mesurer.

8° Acides aminés cycliques halogénés.

Si l'on compare la tyrosine, la mono et dibromotyrosine et la diiodotyrosine d'une part, l'histidine, la monoiodo et la di-iodohistidine d'autre part, on obtient :

tyrosine	= 0,67	histidine	= 0,94
monobromotyrosine	= 0,79	monoiodo histidine	= 1,38
Dibromotyrosine	= 1,25	Diiodo-histidine	= 1,71
Diiodotyrosine	= 1,36		

$$\text{soit : } \frac{K_v \text{ Diiodotyrosine}}{K_v \text{ tyrosine}} = \frac{1,36}{0,67} = 2,03$$

$$\frac{K_v \text{ Dibromotyrosine}}{K_v \text{ tyrosine}} = \frac{1,25}{0,67} = 1,86$$

$$\frac{K_v \text{ Monobromotyrosine}}{K_v \text{ tyrosine}} = \frac{0,79}{0,67} = 1,18$$

$$\frac{K_v \text{ Diiodohistidine}}{K_v \text{ histidine}} = \frac{1,71}{0,94} = 1,79$$

$$\frac{K_v \text{ Monoiodo-histidine}}{K_v \text{ histidine}} = \frac{1,38}{0,94} = 1,46$$

ce qui montre que :

1° L'accroissement de vitesse de désamination est plus grand lorsqu'il y a 2 H remplacés par un halogène que lorsqu'il y en a qu'un seul.

2° Le brome paraît avoir un effet légèrement plus faible que l'iode.

c) Action des halogènes sur la désamination par l'acide nitreux

Comme nous venons de le voir, la tyrosine mono et dibromée, mono et diodée sont plus rapidement désaminées que la tyrosine.

D'autre part, la mono et diiodo histidine sont également plus vite désaminées que l'histidine.

Ces faits nous ont amené à penser que l'augmentation de la constante de vitesse de désamination des acides aminés halogénés par rapport au même acide aminé non halogéné était due à la présence de l'halogène.

Pour le prouver, nous avons fait les expériences suivantes :

1^o Nous avons ajouté à une solution de tyrosine une quantité d'iode correspondant à celle contenue dans la diiodo-tyrosine soit 1,2 cm³ d'iodure de potassium à 2 p. 100 pour 1 cm³ de solution de tyrosine à 1,392 p. 100 (contenant 1 mg d'azote par cm³).

La tyrosine en présence d'iode se désamine pratiquement avec la même vitesse que la diiodotyrosine.

$$\begin{aligned} K \text{ v tyrosine} + IK &= 1,35 \\ K \text{ v diiodotyrosine} &= 1,36 \end{aligned}$$

2^o La même expérience avec l'histidine nous donne les résultats :

$$\begin{aligned} K \text{ v histidine} + IK &= 1,68 \\ K \text{ v diiodo histidine} &= 1,71 \end{aligned}$$

Ces faits ont été le point de départ d'une étude systématique de l'action de l'iode sur la constante de vitesse des différents acides aminés, étude rassemblée dans le tableau III où sont indiquées les constantes de vitesse avec et sans iode ainsi que le rapport

$$\frac{K \text{ v avec I}}{K \text{ v sans I}}$$

Il résulte de ces expériences que :

1^o Presque tous les acides aminés sont désaminés plus rapidement en présence d'iode qu'en l'absence d'iode.

2^o L'iode accélère inégalement la désamination des acides aminés.

De façon plus précise, les acides aminés peuvent être classés d^e la façon suivante d'après l'influence de l'iode sur leur vitesse de désamination :

1^o Acides aminés pour lesquels le rapport $\frac{K \text{ v avec I}}{K \text{ v sans I}}$ est voisin de l'unité.

TABLEAU III

		Kv sans I	Kv avec I	Kv avec I Kv sans I
Mono-amino- Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	0,78	1,43	1,83
	Alanine	1,09	1,90	1,74
	Acide α -aminobutyrique	0,96	1,71	1,78
	Norvaline	0,88	1,50	1,70
	Norleucine	0,80	1,43	1,78
Mono-amino- Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	0,79	—	—
	Leucine	1,04	1,22	1,17
	Isoleucine	0,85	1,05	1,23
Mono-amino- Mono-acides hydroxylés et soufrés	Sérine	1,19	1,62	1,36
	Cystéine	1,71	3,49	2,04
	Cystine	3,40	6,80	2,0
	Méthionine	0,84	0,70	2,02
Mono-amino- diacides	Acide aspartique	1,73	3,31	1,91
	Acide glutamique	1,02	2,16	2,12
Acides di-aminés	Ornithine.....	{ 0,54	0,54	1,0
		{ 0,40	0,40	1,0
	Lysine.....	{ 0,37	0,40	1,08
		{ 0,23	0,28	1,22
Acides β et ω aminés	β -alanine	0,90	1,51	1,68
	Acide β -aminobutyrique	0,59	—	—
	Acide ϵ -aminocaproïque	0,22	0,27	1,23
Acide α -aminés α -substitués	Isovaline	0,15	0,16	1,04
	Acide α -aminosobutyrique	0,33	0,35	1,06
Acides aminés cycliques	Phénylglycine	0,78	1,07	1,37
	Phénylalanine	0,96	1,74	1,81
	Tyrosine	0,67	1,35	2,01
	Histidine	0,94	1,68	1,78

Ces acides aminés dont la désamination n'est pratiquement pas accélérée par l'iode sont ceux qui ont les constantes de vitesse de désamination les plus basses c'est-à-dire :

- Acides diaminés ;
- Mono-amino mono-acides aliphatiques à chaîne ramifiée ;

- Mono-acides aminés en position autre que α ;
- Mono-acides α -aminés et α -substitués.

2^o Acides aminés pour lesquels le rapport $\frac{K v \text{ avec } I}{K v \text{ sans } I}$ est voisin de 2 ; la présence d'iode double la constante de vitesse de désamination ; il s'agit d'acides aminés à constante élevée c'est-à-dire :

- Mono-amino-diacides ;
- Acides aminés à fonctions associées.

3^o Un groupe intermédiaire pour lesquels le rapport $\frac{K v \text{ avec } I}{K v \text{ sans } I}$ est voisin de 1,8.

- Mono-amino mono-acides aliphatiques à chaîne linéaire ;
- Acides aminés cycliques à reste d'alanine.

On peut donc dire d'une manière générale que la vitesse de désamination d'un acide aminé est d'autant plus accélérée par l'iode qu'elle est elle-même plus élevée.

Nous avons également montré que l'addition de bromure de potassium à la tyrosine permet de trouver une constante de vitesse de désamination ($K v = 1,35$) qui se rapproche sensiblement de celle de la dibromo tyrosine ($K v = 1,25$).

L'action du brome à ce point de vue est donc pratiquement identique à celle de l'iode.

*
* *

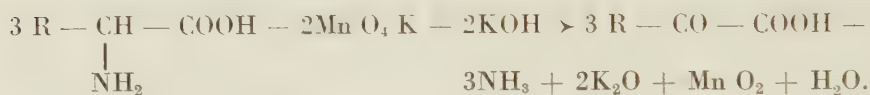
Nous verrons plus loin en comparant le pourcentage d'azote aminé obtenu au moyen de l'acide nitreux aux résultats fournis par les autres méthodes de désamination quelle peut être son application biologique.

Soulignons toutefois dès à présent que les travaux de WILSON [5] ont montré le peu de spécificité de cette réaction qui donne des résultats positifs notamment avec l'urée, l'asparagine, les bases puriques et la créatinine.

CHAPITRE II

DÉSAMINATION PAR LE PERMANGANATE DE POTASSIUM

BUSSI et CACCIONOTI [6] ont récemment proposé un mode de désamination oxydative des amino-acides par le permanganate de potassium en milieu alcalin selon la réaction :



qui, d'après les auteurs, n'est complète qu'en présence de catalyseur (solution de nitrate mercurique dans l'acide nitrique dilué).

Nous avons essayé cette méthode, en utilisant le mode opératoire indiqué dans le chapitre suivant pour la chloramine, dans les conditions suivantes :

A 1 cm³ de solution d'acide aminé contenant 1 mg d'azote α -aminé on ajoute 2 à 3 cm³ de réactif mercurique, quelques cristaux de bioxyde de manganèse (1), 3 cm³ de solution de permanganate de potassium à 3 p. 100 et 20 cm³ de soude à 20 p. 100 et on poursuit une ébullition modérée pendant 25 minutes. Au bout de ce temps l'ammoniac libéré est titré acidimétriquement dans les conditions exposées plus loin.

Il est facile de se rendre compte qu'il y a ainsi un gros excès de réactif oxydant : de façon plus précise 3 cm³ de permanganate de potassium à 3 p. 100 oxydent 126 mg d'azote aminé. On peut donc considérer la concentration en oxydant comme constante pendant la réaction qui est du type mononucléaire irréversible : nous en avons déjà donné l'expression au chapitre I.

Le tableau IV montre que les constantes de vitesse de désamination sont souvent très basses et qu'on ne peut pas envisager d'hypothèse permettant d'interpréter les résultats obtenus, d'ailleurs très irréguliers.

Notons toutefois que la réaction est souvent très incomplète comme nous le verrons dans un autre chapitre : ce mode de désamination apparaît donc comme peu fidèle, nous étudierons plus loin sa spécificité.

(1) L'addition de catalyseur et de bioxyde de Mn n'a qu'une influence négligeable sur les résultats.

TABLEAU IV

		K α à 20°
Mono-amino- Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	0,56
	Alanine	1,00
	Acide α -amino-butyrique	0,77
	Norvaline	0,61
	Norleucine	0,75
Mono-amino mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	0,23
	Leucine	0,77
	Isoleucine	0,66
Mono-amino mono-acides hydroxylés et sulfurés	Sérine	0,44
	Thréonine	0,50
	Cystéine	0,16
	Cystine	0,25
	Méthionine	0,52
	Taurine	0,13
	Acide cystéique	0,11
	Lanthionine	0,22
	Acide djenkolique	0,25
Mono-amino diacides	Acide aspartique	0,17
	Acide glutamique	0,66
Acides diaminés	Ornithine	1,11
	Lysine	1,20
Acides β et ω aminés	β -alanine	0,23
	acide β -aminobutyrique	0,19
	acide ϵ -amino caproïque	—
Acides α -aminés α -substitués	Isovaline	0,03
	Acide α -amino-isobutyrique	—
Acides aminés cycliques	Phényl-glycine	0,19
	Phényl-alanine	0,22
	Tyrosine	0,06
	Histidine	0,32
	Proline	0,038
	Tryptophane	0,13
	Dioxy-phényl-alanine	0,05
Acides aminés aromatiques halogénés	Diodotyrosine	0,03
	Monobromo-tyrosine	0,06
	Dibromo-tyrosine	0,03
	Monoiodo-histidine	0,11
	Di-iodo-histidine	0,04
Guanidino-amino acide	Arginine	0,55

CHAPITRE III

DÉSAMINATION PAR LA CHLORAMINE T

Nous avons vu au chapitre premier que les acides aminés traités par l'acide nitreux réagissent très différemment suivant leur constitution chimique ; pratiquement la constante de vitesse de désamination était d'autant plus élevée que les caractères acides étaient eux-mêmes plus marqués. On est ainsi amené à classer les acides aminés en trois groupes :

- 1^o Ceux qui sont désaminés franchement plus vite que l'alanine
(acides aminés dicarboxyliques ;
(acides aminés soufrés et halogénés.
- 2^o Les acides aminés dont la constante de vitesse est du même ordre que celle de l'alanine.
(mono-amino mono-acides aliphatiques à chaîne linéaire ;
(mono-amino mono-acides aliphatiques à chaîne ramifiée.
- 3^o Les acides aminés désaminés beaucoup plus lentement que l'alanine.
(Diamino mono-acides ;
(Acides β et ω -aminés ;
(Acides α -aminés α -substitués.

Tout se passerait donc dans la réaction à l'acide nitreux comme si la dissociation des groupements à caractères acides réglait la labilité de NH_2 et comme si le voisinage de COOH exaltait la labilité de ce groupement.

Il est donc intéressant de rechercher le comportement des acides aminés vis-à-vis d'agents de désamination qui font en même temps une décarboxylation, étant donné que l'acide nitreux respecte le carboxyle.

On sait depuis les travaux de LANGHELD [7] en 1909 que l'hypochlorite de sodium oxyde les acides aminés selon la réaction schématique:



Cette réaction a été utilisée en 1934 par POLONOVSKI [8, 9] pour le dosage de l'azote aminé par titration acidimétrique de l'ammoniac

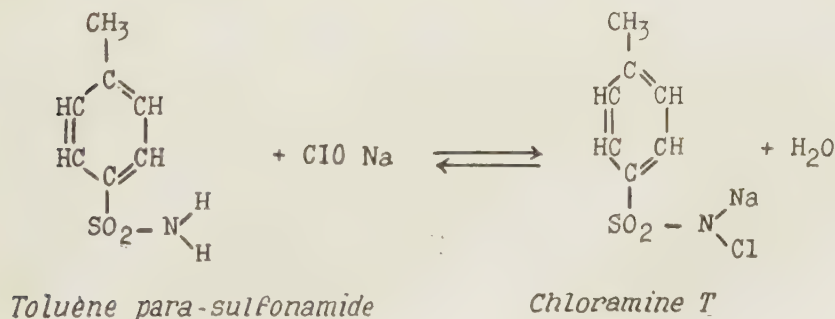
libéré. L'auteur précise les conditions expérimentales en soulignant notamment la nécessité de faire agir goutte à goutte la solution d'hypochlorite sur les acides aminés de façon à éviter un excès de réactif oxydant qui est susceptible de transformer plus ou moins partiellement en azote l'ammoniac libéré, donc de fausser le dosage.

Cette remarque et la difficulté que nous avons eue à obtenir des résultats quantitatifs avec l'hypochlorite de sodium nous ont engagé à étudier un mode d'oxydation analogue mais moins brutal au moyen d'un composé chimique qui se comporte comme une source d'hypochlorite naissant : la chloramine T, utilisée par VAN SLYKE [10] pour doser les acides aminés par dosage du gaz carbonique.

A. — ACTION GÉNÉRALE DE LA CHLORAMINE T SUR LES ACIDES AMINÉS

I — Mécanisme chimique de la réaction

DAKIN [11] a montré que la chloramine T ou sodium paratoluène sulfochloramide résulte de l'action de l'hypochlorite de sodium sur la toluène para sulfonamide selon la réaction :



La réversibilité de cette réaction explique le rôle oxydant de la chloramine T. Il importe de souligner que l'hypochlorite, agent de la désamination, se forme au fur et à mesure de la décomposition de la chloramine.

II — Conditions expérimentales

1^o *Appareillage*. — Le schéma de la figure 1 représente le dispositif très simple nécessaire pour le dosage.

Le ballon A contient une solution d'acide sulfurique diluée à laquelle on a ajouté quelques gouttes de solution saturée de rouge

de méthyle. Cette solution acide est destinée à arrêter les traces d'ammoniac susceptibles de se trouver dans l'atmosphère du laboratoire. La coloration rouge persistante de l'indicateur est le témoin que la solution reste capable de fixer l'ammoniac atmosphérique.

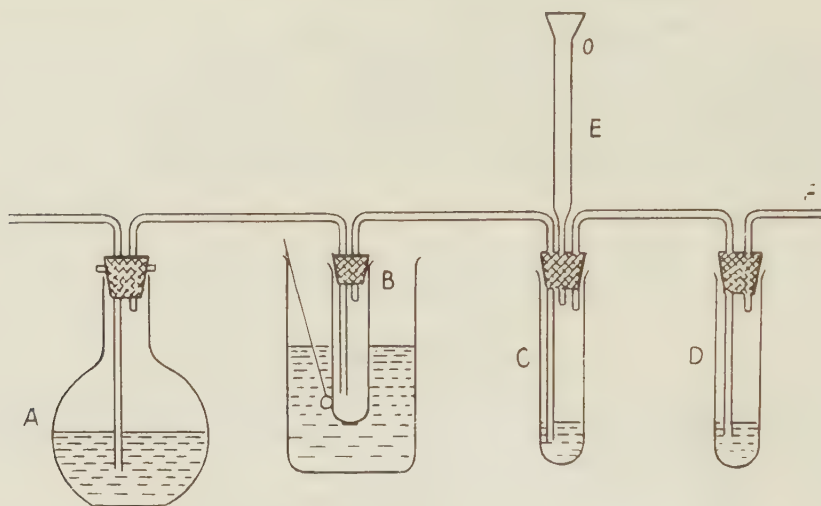


Fig. 1

Le tube de Violette B (longueur 22,5 cm, diamètre 2,5 cm) qui d'ailleurs peut être avantageusement remplacé par un flacon D. de YOVANOVITCH [12] est immergé dans un bain-marie à 70° ; il est destiné à contenir la solution à désaminer et les réactifs de la désamination.

Au moyen de la trompe F, l'ammoniac formé dans le tube B est entraîné dans un autre tube de Violette C où il sera dosé par l'acide sulfurique N/140 contenu dans la burette E. Le tube D, accessoire et pouvant être supprimé, sert de témoin afin de s'assurer que tout l'ammoniac dégagé par la chloramine a bien été fixé dans C.

2° *Technique.* — La burette E (de 10 cm³ graduée en 1/20^e de cm³) étant remplie d'acide sulfurique N/140, on introduit dans les tubes C et D, 5 cm³ d'eau distillée additionnée de 3 gouttes de solution saturée de rouge de méthyle (1). On place ensuite dans le tube B, 1 cm³ de solution d'acide aminé correspondant à 1 mg d'azote aminé et un petit copeau de paraffine destiné à empêcher la formation d'une mousse trop abondante au cours de la réaction.

(1) Nous avons également essayé selon Mc FADYEN [13] le vert de bromocrésol, (virage du jaune au bleu entre les pH 4,0-5,6) les résultats concordent à 1 p. 100 près, aussi avons-nous conservé l'usage du rouge de méthyle dont nous avons l'habitude.

Si nécessaire, la solution est neutralisée en présence de phénolphtaléine ; puis on ajoute 0,5 cm³ de carbonate de soude à 10 p. 100, (1) enfin on introduit 1 cm³ de solution récemment préparée (une semaine au maximum) de chloramine T à 10 p. 100. Le tube B est mis en place dans le bain-marie à 70° et on fait l'aspiration. Dès qu'une quantité suffisante d'ammoniac arrive dans le tube C, le rouge de méthyle vire au jaune (pH : 4,2-6,3) on rétablit immédiatement la teinte rouge par addition d'acide sulfurique titré et l'on fait de même à chaque virage jusqu'à cessation du dégagement soit en général 15 minutes. On peut ainsi connaître, toutes les minutes, la quantité d'ammoniac formé.

B — ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA RÉACTION

I — Expression de la constante de vitesse

L'expérience montre que, si la concentration en chloramine est suffisante, la désamination est complète et la réaction est du type bimoléculaire irréversible dont la constante de vitesse est donnée par l'expression :

$$K_v = \frac{2,3}{t(a-b)} \cdot \log \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$$

a et b étant respectivement les concentrations moléculaires de la chloramine et de l'azote aminé au début de la réaction ($t = 0$), x étant la concentration moléculaire de l'azote aminé au bout d'un temps, t , quelconque.

II — Influence de la concentration en chloramine

Avec une prise d'essai de 1 mg d'azote aminé, soit une concentration moléculaire de $0,071 \times 10^{-3}$ nous avons employé deux concentrations différentes en chloramine :

— 0,5 cm³ de solution à 10 p. 100, soit une concentration moléculaire de $0,177 \times 10^{-3}$;

— 1 cm³ de solution à 10 p. 100, soit une concentration moléculaire de $0,354 \times 10^{-3}$.

Les constantes de vitesse correspondantes sont :

$$K_1 = \frac{10^3 \times 21,7}{t} \log \frac{0,0126 \times 10^{-3} - 0,071 x}{0,0126 \times 10^{-3} - 0,177 x}$$

$$K_2 = \frac{10^3 \times 8,13}{t} \log \frac{0,025 \times 10^{-3} - 0,071 x}{0,025 \times 10^{-3} - 0,354 x}$$

(1) Solution de carbonate de soude *cristallisé* à 10 p. 100.

Nous indiquons dans le tableau V les valeurs trouvées pour ces constantes de vitesse calculées par les formules précédentes en laissant la température constante (50°) et en considérant deux concentrations différentes en chloramine.

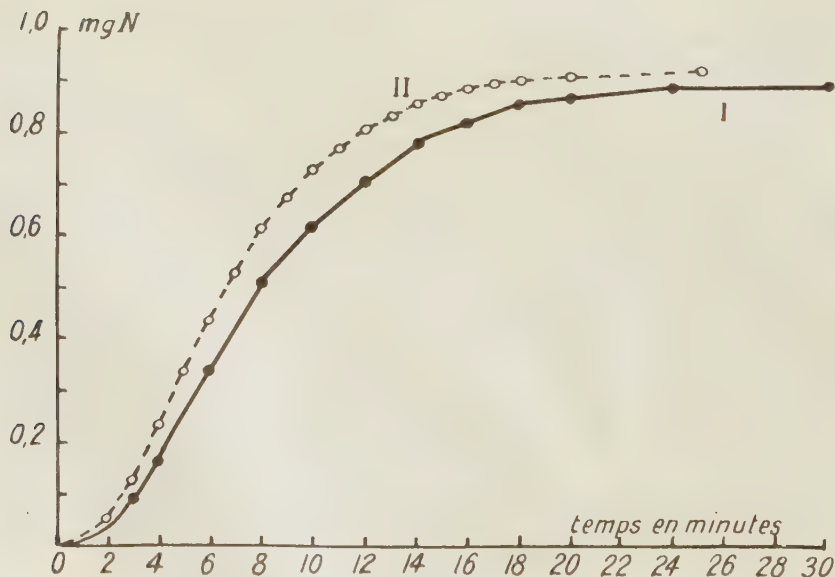
TABLEAU V

	Chloramine $= 0,177 \times 10^{-3}$	Chloramine $= 0,354 \times 10^{-3}$
Alanine	$0,77 \times 10^3$	$0,46 \times 10^3$
Norleucine	$1,65 \times 10^3$	$0,80 \times 10^3$
Acide aspartique	$0,37 \times 10^3$	$0,37 \times 10^3$
Isovaline	$2,29 \times 10^3$	$1,07 \times 10^3$
Phénylalanine	$0,30 \times 10^3$	$0,48 \times 10^3$

Il résulte de ces chiffres que :

1° L'influence de la concentration en chloramine n'est pas la même sur tous les acides aminés.

GRAPHIQUE II



DESAMINATION DE L'ALANINE

Courbe I : [Chloramine] : $0,177.10^{-3}$

Courbe II : [Chloramine] : $0,354.10^{-3}$

2° D'une manière générale, la constante de vitesse de la réaction est abaissée lorsque la concentration en chloramine est plus élevée. Il ne faudrait pas en conclure que la réaction est plus lente ; la graphique II montre au contraire que la désamination totale est obtenue plus rapidement lorsque la concentration en chloramine est plus élevée. Les valeurs des constantes et les courbes signifient seulement que la réaction est plus rapide en valeur absolue si la concentration en chloramine augmente mais que relativement, cette augmentation de concentration n'accroît pas la vitesse.

III — Influence de la température

Nous avons repris les mêmes expériences en maintenant constante la concentration en chloramine et en faisant varier la température (50 et 70°).

TABLEAU VI

	[Chloramine] = $0,177 \times 10^{-3}$		[Chloramine] = $0,354 \times 10^{-3}$	
	50°	70°	50°	70°
Alanine	$0,77 \times 10^3$	$1,35 \times 10^3$	$0,46 \times 10^3$	$1,12 \times 10^3$
Norleucine	$1,56 \times 10^3$	$3,20 \times 10^3$	$0,80 \times 10^3$	$2,75 \times 10^3$
Acide aspartique	$0,37 \times 10^3$	$1,39 \times 10^3$	$0,37 \times 10^3$	$0,51 \times 10^3$
Isovaline	$2,29 \times 10^3$	$3,96 \times 10^3$	$1,07 \times 10^3$	$2,15 \times 10^3$
Phénylglycine	$0,30 \times 10^3$	$1,05 \times 10^3$	$0,48 \times 10^3$	—

Les résultats du tableau VI montrent l'influence de la température sur la réaction. Dans tous les cas l'augmentation de température accélère la désamination. Nous nous sommes alors demandé si, à la température de 70° en milieu oxydant, il ne se produit pas une décomposition spontanée de chloramine pouvant libérer de l'ammoniac. Il n'en est rien, et même à 100°, il n'y a jamais libération d'ammoniac venant de la chloramine.

Inversement nous avons pu vérifier qu'aux températures utilisées (50° et 70°) l'oxydation de l'ammoniac est pratiquement négligeable comme le montrent les résultats du tableau VII obtenus en traitant des quantités différentes d'azote ammoniacal par 1 cm³ de solution à 10 p. 100 de chloramine T et en dosant les quantités retrouvées.

Aux erreurs d'expérience près, on peut évaluer à 95 p. 100 la proportion d'ammoniac dosé après désamination à la chloramine.

TABLEAU VII

Azote ammoniacal introduit en mg	Azote ammoniacal retrouvé p. 100	
	50°	70°
0,2	100	94,5
0,4	97,5	92,7
0,6	96	96
0,8	93,5	94,3
1,0	94	92

IV — Influence de l'alcalinité

On sait qu'il suffit d'une faible alcalinisation pour déplacer l'ammoniac ; par contre une alcalinité excessive est toujours susceptible de provoquer au moins partiellement une réaction de désamination ; d'où, avant de choisir les conditions optima d'alcalinité, la nécessité de vérifier le pouvoir désaminant dû à l'alcalinisation.

Nous avons pris pour cela 1 mg d'azote aminé (alanine) et nous avons dosé l'ammoniac libéré dans diverses conditions d'alcalinisation. On obtient les résultats ci-dessous :

TABLEAU VIII

	NH ₃ formé
Avec 0,5 cm ³ de CO ₃ Na ₂ à 40 p. 100	0,065 mg.
— — — 20 p. 100	0,052 mg.
— — — 10 p. 100	0,050 mg.
de solution saturée de CO ₃ Li ₂	0,050 mg.
2 gouttes de solution saturée de CO ₃ Li ₂	0,042 mg.

Étant donné que deux gouttes de solution saturée de carbonate de lithium donne l'erreur minima, nous avons inversement vérifié qu'une telle alcalinisation est insuffisante pour entraîner la totalité de l'ammoniac formé au cours de la désamination ; l'erreur faite étant d'autant plus grande que la quantité d'ammoniac à entraîner est elle-même plus importante (Tableau IX).

Nous avons donc définitivement adopté comme alcalinisant 0,5 cm³ de solution de carbonate de soude à 10 p. 100.

TABLEAU IX

Azote aminé introduit	Ammoniac dosé (exprimé en N)	
	0,5 cm ³ CO ₃ Na ₂ à 10 p. 100	2 gouttes CO ₃ Li ₂ saturé
0,2 mg.	0,19 mg.	0,17 mg.
0,4 mg.	0,39 mg.	0,29 mg.
0,6 mg.	0,57 mg.	0,50 mg.
0,8 mg.	0,78 mg.	0,66 mg.
1,0 mg.	0,94 mg.	0,78 mg.

C — Comportement des acides aminés au cours de la réaction

Nous avons rassemblé dans le tableau X les valeurs des constantes de désamination des acides α -aminés par la chloramine T.

- a) à 50° avec 0,5 cm³ de chloramine à 10 p. 100 ;
- b) à 70° avec 1 cm³ de chloramine à 10 p. 100.

Les résultats indiqués sont les constantes relatives calculées par rapport à celles de l'alanine, c'est-à-dire que les constantes de vitesse mesurées dans les conditions ci-dessus pour l'alanine, d'une part $0,77 \times 10^3$ (à 50° et 0,5 cm³ de chloramine à 10 p. 100) et $1,12 \times 10^3$ (à 70° et 1 cm³ de chloramine à 10 p. 100) sont respectivement prises égales à l'unité.

Les courbes des graphiques III et IV relatives à la valine et à la lysine montrent l'allure du phénomène. On peut constater la régularité de la désamination et les valeurs inégales de la pente des courbes à l'origine, valeurs objectivées par la constante de vitesse. La double influence de la concentration en chloramine et de la température apparaît également sur ces graphiques.

On note enfin que le temps nécessaire pour obtenir la désamination totale est relativement long (15 minutes à 70°, 30 minutes à 50°) ce qui permet une étude précise de la cinétique de la réaction.

Ces graphiques comme les résultats du tableau X soulignent néanmoins des différences importantes dans le comportement des divers acides aminés.

Nous avons essayé d'interpréter ces divergences comme dans le cas de la désamination hydrolytique par l'acide nitreux en faisant intervenir des particularités de structure propres à chaque acide aminé.

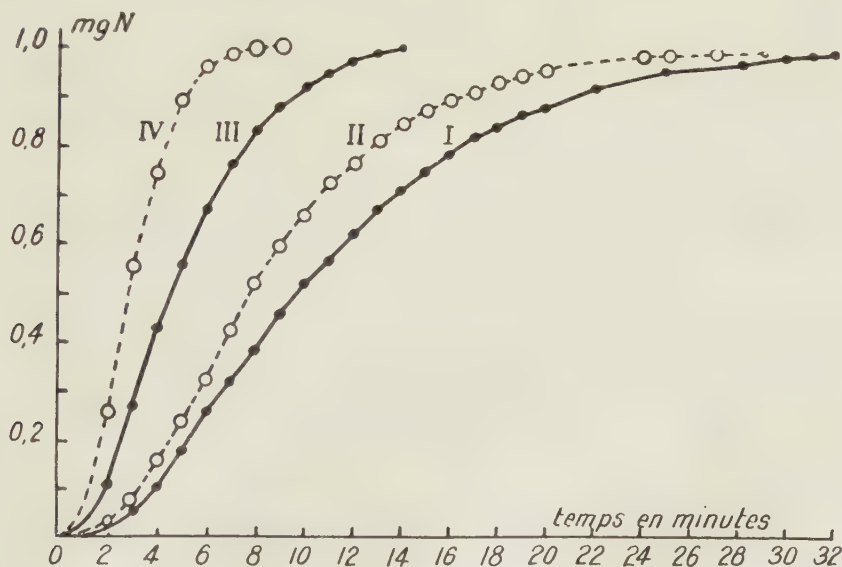
TABLEAU X

		K v 50°	K v 70°
Mono-amino- Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	0,05	0,09
	Alanine	1,00	1,00
	Acide α -amino butyrique	1,18	1,35
	Norvaline	1,45	1,40
	Norleucine	2,14	2,47
Mono-amino- Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	0,94	1,63
	Leucine	0,98	1,09
	Isoleucine	1,15	1,10
Mono-amino- Mono-acides hydroxylés et soufrés	Sérine	0,72	0,55
	Cystéine	—	0,25
	Cystine	—	0,20
	Méthionine	0,71	0,49
	Taurine	0	0
	Acide cystéique	—	0,18
	Thréonine	—	0,06
	Lanthionine	—	0,10
	Acide djenkolique	0,33	0,17
Mono-amino diacides	Acide aspartique	0,48	0,46
	Acide glutamique	1,33	0,92
Acides diaminés	Ornithine	0,45	0,24
	Lysine	0,49	0,62
Acides β et ω aminés	β -alanine	0	0
	Acides β -amino-butyrique	0	0
	Acide ϵ -amino-caproïque	0	0
Acides α -aminés α -substitués	Isovaline	2,98	1,93
	Acide α -amino isobutyrique	—	—
Acides aminés cycliques	Phényl-glycine	0,39	0,39
	Phényl-alanine	0,67	0,90
	Tyrosine	1,00	0,91
	Histidine	0,54	0,65
	Proline	—	0,29
	Tryptophane	0,67	1,62
	Dioxy-phénylalanine	0,41	0,47
Acides aminés aromatiques halogénés	Diiodotyrosine	1,05	1,30
	Monobromotyrosine	—	0,30
	Dibromotyrosine	—	0,59
	Monoiodo-histidine	—	0,11
	Diiodo-histidine	—	0,06
Guanidino-amino acide	Arginine	0,52	1,07

I — Monoamino monoacides à chaîne linéaire

Si l'on compare les constantes de vitesse de désamination de ces composés à celles de l'alanine (à 50° et avec 0,5 cm³ de chloramine à 10 p. 100) on remarque que ces constantes varient dans le même sens que les poids moléculaires ou les longueurs de chaîne (exprimées arbitrairement en nombre d'atomes de carbone).

Sans que l'on puisse établir de relation quantitative rigoureuse qui n'ajouterait d'ailleurs rien au sens du phénomène, on peut dire que la vitesse de désamination des mono-amino mono-acides à chaîne linéaire est d'autant plus grande que leurs poids moléculaire est plus élevé ou que leur chaîne est plus longue.



GRAPHIQUE III

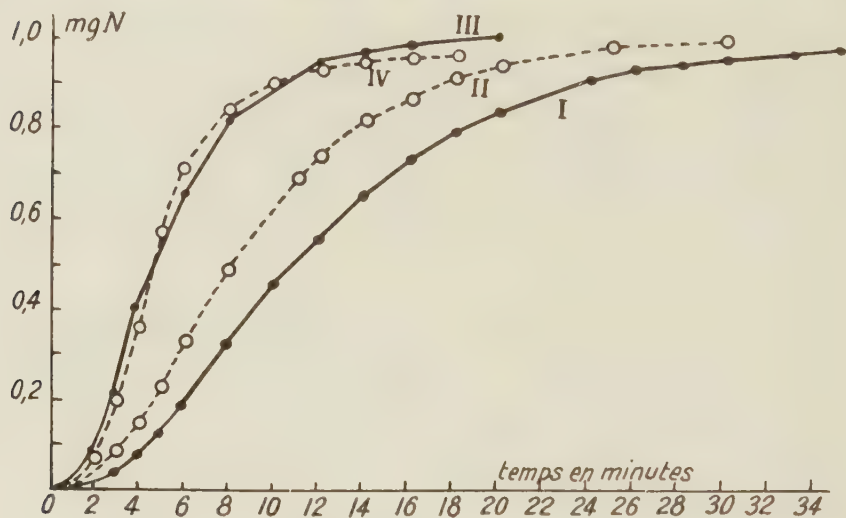
DÉSAMINATION DE LA VALINE

- Courbe I : Température 50° ; [chloramine] : 0,177.10⁻³ ;
 Courbe II : Température 50° ; [chloramine] : 0,354.10⁻³ ;
 Courbe III : Température 70° ; [chloramine] : 0,177.10⁻³ ;
 Courbe IV : Température 70° ; [chloramine] : 0,354.10⁻³ .

Le cas de la glycine est particulier ; sa constante de vitesse est anormalement basse ce qui s'explique par le fait suivant :

Au cours de la désamination du glyocolle, il se produit du formol reconnaissable à l'odeur piquante et lacrymogène dégagée dans l'eau

de la trompe, (1) Étant donnée la réactivité bien connue de ce composé sur les groupements aminés des amino-acides, il en résulte un blocage de la fonction NH^2 et vraisemblablement une difficulté accrue à obtenir



GRAPHIQUE IV

DÉSAMINATION DE LA LYSINE

Courbe I : Température 50° ; [chloramine] : $0,177 \cdot 10^{-3}$;
 Courbe II : Température 50° ; [chloramine] : $0,354 \cdot 10^{-3}$;
 Courbe III : Température 70° ; [chloramine] : $0,177 \cdot 10^{-3}$;
 Courbe IV : Température 70° ; [chloramine] : $0,354 \cdot 10^{-3}$.

	K v	Poids moléculaire	Nombre d'atomes de C
Glycine	0,05	75	2
Alanine	1,0	89	3
Acide α -aminobutyrique	1,18	103	4
Norvaline	1,45	117	5
Norleucine	2,14	131	6

la désamination. Si, en effet, l'on ajoute une solution de formol à une solution d'acide aminé, l'action désaminante de la chloramine est considérablement ralentie au point de devenir presque nulle si la concen-

(1) On sent également l'odeur de jacinthe de l'aldéhyde phényl-acétique pendant la désamination de la phényl-alanine.

tration en formol est suffisante. Voici, par exemple, les taux d'azote aminé retrouvé pour une prise d'essai théorique de 1 mg en présence de quantités croissantes de formol.

Formol ajouté	$\frac{[\text{Formol}]}{[\text{Azote}]}$	Azote aminé dosé
2,14 mg.	1	0,28 mg.
4,28 mg.	2	0,25 mg.
6,42 mg.	3	0,27 mg.
8,56 mg.	4	0,24 mg.
40 mg.	20	0,12 mg.

Mais si cette action du formol s'exerce toujours dans le même sens, l'expérience montre qu'elle est très inégale selon les acides aminés ; il semble y avoir un rapport entre la vitesse de désamination propre de ces acides aminés et l'action du formol.

II — Monoamino-monoacides à chaîne ramifiée

La valine et l'isovaline ne diffèrent que par la place du CH_3 en position latérale par rapport au carboxyle :

Valine : CH_3 en β par rapport au CCOH : $K_v = 0,94$.

Isovaline : CH_3 en α par rapport au COOH : $K_v = 2,98$.

De même leucine et isoleucine :

Leucine : CH_3 en γ par rapport au COOH : $K_v = 0,98$.

Isoleucine : CH_3 en β par rapport au COOH : $K_v = 1,15$.

Enfin valine et isoleucine :

Valine : poids moléculaire : 117 tous deux CH_3 en β $K_v = 0,94$

Isoleucine : poids moléculaire : 131 $K_v = 1,15$

On retrouve l'influence du poids moléculaire précédemment soulignée.

III — Monoamino-monoacides hydroxylés et soufrés

L'expérience montre que la vitesse de désamination dépend de la dissociation du groupement NH_2 . Ce fait peut être rapproché de celui précédemment signalé au cours de la désamination des mono peptides par l'acide nitreux, dépendant de la dissociation du carboxyle. Car, ici, l'action de la chloramine est d'abord une décarboxylation secondairement suivie de la désamination ; la désamination est donc influencée dans la mesure où la décarboxylation l'est elle-même par la dissociation du groupement aminé.

IV — Monoamino-diacides

Le même fait est à signaler ici, compte tenu des recherches de VAN SLYKE, DILLON, Mc FADYEN et HAMILTON [10] montrant que l'action de la chloramine n'est pas la même sur l'acide aspartique et sur l'acide glutamique. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'acide aspartique a ses deux carboxyles détruits par la chloramine T alors que l'acide glutamique n'en a qu'un. Tout se passe comme si l'action de chloramine transformait partiellement l'acide aspartique en une amine qui n'est pas désaminée par ce réactif.

V — Acides aminés cycliques

La phénylalanine, la tyrosine, la diiodotyrosine et l'histidine sont voisins de l'alanine ; la phénylglycine est voisine de la glycine compte tenu des constantes de dissociation du groupement aminé respectivement inférieures à celle de l'alanine et de la glycine.

*
* *

En résumé, l'étude cinétique de la désamination par la chloramine T conduit à faire intervenir les poids moléculaires des acides aminés, la valeur de la constante de dissociation de leur groupement aminé et, le cas échéant, la place de la chaîne latérale sur la chaîne principale pour les acides aminés à chaîne ramifiée.

De façon générale, le comportement des mono peptides dans cette réaction semble être l'inverse de celui qui a été observé dans la désamination hydrolytique par l'acide nitreux ; ce fait est probablement dû à ce que la désamination par la chloramine est précédée d'une décarboxylation.

CHAPITRE IV

DÉSAMINATION PAR LA NINHYDRINE

On sait que les acides α -aminés chauffés avec un excès de ninhydrine en solution aqueuse bouillante sont désaminés avec dégagement d'ammoniac ; la réaction est complète en quelques minutes, mais le rendement n'est quantitatif que si le pH de la solution est de 1,0 à 2,5 comme l'ont montré VAN SLYKE, DILLON, Mc FADYEN et HAMILTON [10].

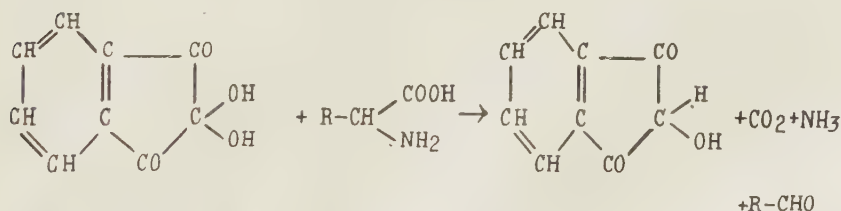
Le dosage de l'ammoniac ainsi libéré peut alors permettre l'évaluation de l'azote aminé lorsqu'on a éliminé l'excès de ninhydrine (Mc FADYEN [13]).

Il est donc possible d'étudier la cinétique de cette réaction.

A — Action de la ninhydrine sur les acides α -aminés

1^o Principe.

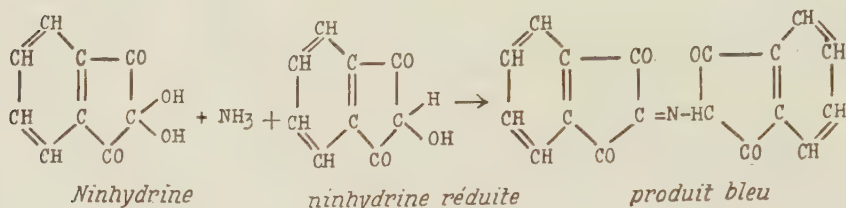
La désamination par la ninhydrine (hydrate de tricéto-hydrindène) est représentée par la réaction :



qui, dans les conditions que nous indiquons ci-dessous, est une réaction bimoléculaire irréversible dont la constante de vitesse est par conséquent donnée par l'expression déjà indiquée pour la chloramine (voir chapitre précédent.)

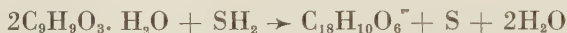
Elle n'est complète, à pH voisin de 2, qu'en présence d'un excès de ninhydrine, excès qui doit être éliminé après la réaction de désamination ; Mc FADYEN a en effet montré que même pour ces faibles valeurs du pH il se produit une couleur bleue transitoire se transformant en jaune

pâle ce qui indique une condensation plus ou moins importante entre la ninhydrine, son produit de réduction et l'ammoniac selon la réaction :



L'élimination de l'excès de ninhydrine est donc la condition nécessaire d'une évaluation correcte de l'ammoniac produit par la désamination.

La ninhydrine peut être soit détruite, par oxydation au moyen de l'eau oxygénée selon la technique de SOBEL [25], soit par précipitation complète selon l'une ou l'autre des deux méthodes, décrites par RUHE-MANN [14], précipitation en hydrindantine par H_2S :



ou condensation avec l'o-phénylène diamine pour donner de la dicéto-phénazine ; les deux composés hydrindantine et dicéto-phénazine sont insolubles à $\text{pH} = 2,5$.

Enfin l'ammoniac entraîné par un fort courant d'air est recueilli dans une solution d'acide borique comme l'indiquent MERKER et WAGNER [15] puis dosé par une solution titrée d'acide sulfurique en présence de rouge de méthyle.

L'étude cinétique de la réaction de désamination par la ninhydrine est rendue compliquée par le fait qu'après un temps donné de réaction, celle-ci doit être bloquée comme nous venons de l'indiquer ; en d'autres termes, à chaque temps de réaction, correspond un dosage alors que, comme nous l'avons montré pour la désamination par la chloramine T, une même prise d'essai permet de suivre la cinétique de la réaction.

Nous nous sommes néanmoins imposé ce lourd travail expérimental afin de pouvoir déterminer pour chaque acide aminé la constante de vitesse de réaction.

2° Description du protocole expérimental.

On introduit dans un tube à centrifuger cylindroconique de 20 cm³ environ, 1 cm³ de solution d'acide aminé correspondant à 1 mg d'azote aminé et 50 mg de tampon citraté à $\text{pH} = 2,5$; ce tampon est préparé d'après les données de VAN SLYKE, Mc FADYEN et HAMILTON [16] en mélangeant 2,06 g. de citrate trisodique ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) soit 2,50 g. du sel commercial courant à 11H₂O avec 19,51 g. d'acide citrique.

On agite jusqu'à dissolution puis on ajoute 50 mg de ninhydrine en poudre et 1 goutte d'alcool octylique. Boucher le tube à centrifuger avec un bouchon muni de 2 tubes soudés (fig. 2).

L'extrémité A est obturée par un tube de caoutchouc muni d'une pince de Mohr. On porte ensuite l'ensemble au bain-marie bouillant pendant un temps déterminé (1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, ou 15 minutes). Au bout de ce temps le tube est immédiatement plongé dans la glace fondante; l'extrémité A est branchée sur un appareil générateur d'hydrogène sulfuré durant 3 à 4 minutes; il se forme un abondant précipité. L'extrémité du tube B est alors adaptée à une trompe à vide durant 5 minutes environ afin de chasser l'hydrogène sulfuré; on enlève le bouchon en ayant bien soin de rincer la partie inférieure du tube A avec environ 1 cm³ de solution à 5 p. 100 de tampon citraté,

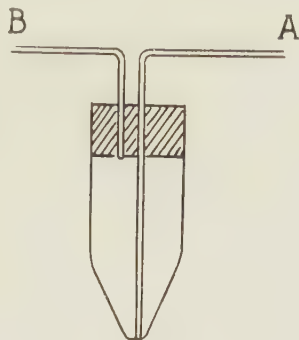


Fig. 2

on centrifuge et on décante sur un filtre en verre fritté. Le précipité est remis en suspension dans 2 cm³ de solution citratée, on centrifuge et on décante comme précédemment et les liquides filtrés sont réunis dans un tube de Violette d'où l'ammoniac est entraîné après alcalinisation et dosé acidimétriquement avec SO₄H₂ N/140.

B — Détermination de la constante de vitesse

Le calcul de la constante de vitesse s'effectue à partir du résultat de ce dosage par la formule indiquée plus haut en remplaçant respectivement *a* et *b* par les valeurs numériques ci-dessous :

$$a = \text{concentration moléculaire en ninhydrine} = \frac{0,050}{178} = 0,281 \times 10^{-3}$$

b = concentration moléculaire en azote aminé au temps *t* = 0 soit 0,071. ce qui conduit à la formule.

$$K_v = \frac{10^3}{t} \times 11 \times \text{Log} \frac{0,02 \times 10^{-3} - 0,071 x}{0,02 \times 10^{-3} - 0,28 x}$$

dans laquelle *x* est la concentration en azote α-aminé au temps *t* considéré; on obtient la valeur de *x* en multipliant par 0,071 × 10⁻⁴ le nombre de cm³ trouvés en titrant l'ammoniac par l'acide sulfurique N/140.

C — Comportement individuel des acides aminés au cours de la réaction

Le tableau XI représente les valeurs des constantes de vitesse de désamination des acides aminés par la ninhydrine.

De façon générale, les constantes de vitesse sont assez voisines les unes des autres ; un tel résultat, différent de ce que nous avons pu constater avec la chloramine, est vraisemblablement dû à la température élevée à laquelle s'effectue la réaction de désamination, température telle que les différences de comportement cinétique sont atténuées.

Néanmoins, nous avons pu faire les constatations suivantes :

TABLEAU XI

		K v
Mono-amino mono-acides à chaîne linéaire	Glycine	1,27
	Alanine	1,00
	Acide α -aminobutyrique	0,97
	Norvaline	0,97
	Norleucine	0,92
Mono-amino mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	0,99
	Leucine	0,97
	Isoleucine	0,88
Mono-amino mono-acides hydroxylés et soufrés	Sérine	0,82
	Thréonine	1,25
	Méthionine	1,07
	Lanthionine	0,29
	Acide djenkolique	1,0
	Cystéine	0,27
	Cystine	0,95
	Acide cystéique	0,92
Mono-amino-diacides	Acide aspartique	0,37
	Acide glutamique	2,0
Acides diamminés	Ornithine	0,55
	Lysine	0,86
Acides aminés cycliques	Phénylglycine	0,73
	Phénylalanine	0,39
	Tyrosine	0,10
	Di-iodotyrosine	0,54
	Di-bromotyrosine	0,69
	Monobromotyrosine	0,65
	Dioxyphénylalanine	0,32
	Histidine	1,20
	Proline	0,13
	Tryptophane	0,24

TABLEAU XI (Suite)

		K v
Acides aminés en β ou en ω	β -alanine	0
	Acide β -aminobutyrique	0
	Acide ε -aminocaproïque	0
Acides α -aminés α -substitués	Isovaline	0
	Acide α -amino-isobutyrique	0
Guanidino-amino-acide	Arginine	1,0

Les constantes de vitesse indiquées sur ce tableau sont calculées par rapport à celle de l'alanine prise égale à l'unité.

1° Les mono-amino mono-acides à chaîne linéaire ont pratiquement le même comportement vis-à-vis de la ninhydrine et il en est de même des mono-amino mono-acides à chaîne ramifiée.

2° Parmi les acides aminés hydroxylés et soufrés la cystéine et la lanthionine cèdent environ la moitié de leur azote ; nous avons pu vérifier qu'ils sont l'un et l'autre partiellement précipités par la ninhydrine et de ce fait ne sont qu'incomplètement désaminés ; les autres acides aminés de ce groupe réagissent de façon sensiblement normale.

3° Comme nous l'avons montré au cours de la désamination par la chloramine, l'acide aspartique est bien moins désaminé que l'acide glutamique.

4° L'ornithine réagit très différemment de la lysine, elle ne cède que la moitié de son azote α -aminé.

On peut émettre l'hypothèse qu'au cours de la désamination à $pH = 2$, une partie de l'ornithine est transformée en noyau pyrrolidine qui, comme l'ont montré GRASSMANN et VON ARNIM [17], ne dégage pas d'ammoniac sous l'action de la ninhydrine.

5° A l'exception de la phényl-glycine, les acides aminés aromatiques ne réagissent qu'incomplètement, il y a vraisemblablement lieu d'envisager des cyclisations partielles aboutissant à des composés de nature indolique.

Cela est appuyé par le fait que la proline et le tryptophane, dont on connaît aujourd'hui les possibilités de remaniement de cycles, sont très mal désaminés.

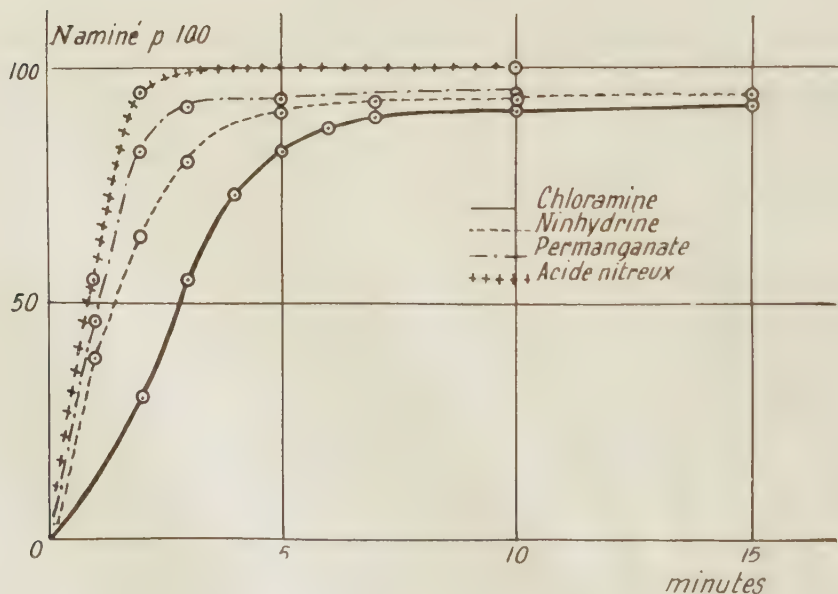
CHAPITRE V

COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTS MODES DE DÉSAMINATION ÉTUDIÉS

A — Précision des différentes méthodes utilisées

Le tableau XII représente le pourcentage d'azote aminé dosé par chacune des méthodes étudiées, la réaction étant terminée ; en d'autres termes, les chiffres d'azote indiqués représentent la quantité maxima que l'on peut obtenir et qu'on ne dépasserait pas en prolongeant le temps de réaction (1).

Nous indiquons ci-dessous sur le même graphique la désamination en fonction du temps de l'alanine par les quatre méthodes étudiées :



Désamination comparée de l'alanine par les quatre méthodes utilisées

(1) Précisons que, pour la chloramine, les pourcentages indiqués sont ceux obtenus avec 1 cm³ de solution à 10 p. 100 de chloramine T et à 70°.

Dans les quatre cas on arrive à un palier ; c'est la valeur de ce palier que nous avons prise comme pourcentage d'azote aminé libéré.

Ces courbes de désamination ont pratiquement toujours la même allure exponentielle correspondant aux réactions irréversibles monomoléculaires (acide nitreux, permanganate de K) et bimoléculaires (chloramine, ninhydrine).

B — Spécificité

1^o A l'exception de la proline et de l'isovaline, tous les acides α -aminés que nous avons étudiés sont désaminés par l'acide nitreux.

Comme VAN SLYKE [18] le signale, nous avons pu constater que certains donnent un taux d'azote assez nettement supérieur au taux théorique, notamment la glycine, la cystine qui, même pendant un temps court de réaction, réduisent un peu l'oxyde d'azote en donnant par conséquent naissance à de l'azote ne provenant pas du groupement aminé.

D'autre part, la deuxième fonction aminée des acides diaminés (ornithine et lysine) est en grande partie désaminée mais non en totalité (du moins dans les délais considérés soit 15 minutes).

Enfin l'histidine, l'arginine et surtout le tryptophane libèrent de l'azote non aminé pendant la réaction.

Il résulte de ces remarques que la désamination par l'acide nitreux n'est pas spécifique des groupements α -aminés ; nous avons d'ailleurs souligné que divers autres composés (urée, asparagine, créatinine, composés puriques) réagissent avec ce réactif. Cette méthode de désamination apparaît donc trop peu spécifique pour être applicable aux milieux biologiques dans le dosage de l'azote α -aminé.

2^o La désamination par la chloramine comme celle par la ninhydrine s'accompagne de décarboxylation et présente de ce fait un caractère évident de spécificité des acides α -aminés.

On constate tout d'abord que la plupart des acides aminés courants sont convenablement désaminés par l'un et l'autre réactif. Pour préciser ce fait, nous avons souligné sur le tableau XII, le taux le plus élevé obtenu pour chaque acide aminé.

La démonstration de la spécificité de l'une ou l'autre des méthodes de désamination que nous avons étudiées ne peut être faite qu'en montrant l'action négative des réactifs sur les composés non α -aminés.

Nous avons fait cette étude avec trois groupes de composés :

- 1^o Acides aminés en position autre que α ,
- 2^o Peptides,

TABLEAU XII

		Acide Nitreux	Chloro mine T	Ninhydrine		Per- manga- nate de K
				1	2	
Mono-amino- Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	104	40,5	91,5	91	89,5
	Alanine	100	94	95,5	91,5	93,5
	Acide α -aminobuty- rique	100	96	97	90	93
	Norvaline	100	100	99	95	91
	Norleucine	98	99	92	87	82
Mono-amino- Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	98	100	94,5	94,8	86
	Leucine	100	96,5	90	91	90
	Isoleucine	100	100	95,5	95	86
	Isovaline	60	95	11	16,5	9,5
Mono-amino- Mono-acides Hydroxylés et soufrés	Sérine	100	92	100	99	67,5
	Cystéine	102	45,5	41	54	50
	Cystine	106	53	84	58	58
	Acide cystéique	100	67,5	82	78	42
	Méthionine	97	85	90	92	85
	Thréonine	—	53	100	90,5	64,5
	Lanthionine	88	35	52	54	39,5
	Acide djenkolique	99	46	83	69	41,5
Mono-amino- diacides	Acide aspartique	100	87	82	83	50
	Acide glutamique	100	92,5	100	89,5	89
Acides diaminés	Ornithine	160	40,7	50	52	110
	Lysine	141	95	95	106	114
Acides aminés cycliques	Phénylglycine	96	86	93,5	100	75
	Phénylalanine	100	89,5	52,5	87,5	90
	Tyrosine	100	87,5	55,5	66	13
	Di-iodotyrosine	100	86,2	66	66,5	10
	Di-bromotyrosine	103	91	84,5	101	18
	Histidine	104	85,5	85	100	68
	Proline	0	67,5	15	27,5	16
	Tryptophane	114	113	35	44	31
Guadinino-amino- Acide	Dioxyphénylalanine	—	58,5	62	68	17
Guadinino-amino- Acide	Arginine	102	94,5	97,5	80	69,5

1. — L'excès de ninhydrine est précipité par SH_2 .

2. — L'excès de ninhydrine est éliminé par H_2O_2 .

3° Quelques composés d'intérêt biologique ou faisant partie de l'azote non protéique du plasma.

Cette étude est rassemblée dans le tableau XIII.

1° *Acides aminés en position autre que α .*

Seules, la chloramine et la ninhydrine ont une action pratiquement négligeable sur ces acides aminés qui sont au contraire désaminés par l'acide nitreux et le permanganate de potassium.

2° *Peptides.*

Les quatre méthodes étudiées fournissent de l'azote à partir des peptides c'est-à-dire à partir de groupements non α -aminés.

Quelques faits précis se dégagent du tableau XIII ;

a) c'est manifestement la chloramine qui donne les résultats les plus faibles ; la ninhydrine, le permanganate de potassium et l'acide nitreux fournissent des quantités d'azote de plus en plus élevées.

b) Étant donné que les groupements aminés non α par rapport au carboxyle ne sont pas touchés par la chloramine ni la ninhydrine, comme nous venons de le montrer, il en résulte que l'azote dosé provient nécessairement de l'hydrolyse des peptides par les réactifs désaminants.

On note alors immédiatement des différences très importantes dans l'intensité de cette hydrolyse selon les peptides : c'est ainsi en particulier que les glycyl-peptides sont beaucoup plus hydrolysés que les leucyl-peptides.

Ces résultats sont à rapprocher des mêmes divergences constatées par HERKEN et SCHUNK [19] sur les vitesses de décarboxylation par l'hypochlorite.

D'autre part, la mise en évidence du même phénomène d'hydrolyse ressort des taux d'azote obtenus par action sur les peptides de l'acide nitreux. Car si ce réactif ne désaminait que les groupements aminés non α par rapport au carboxyle, les chiffres obtenus devraient être au plus égal à 100 (représentant la totalité de l'azote aminé de la prise d'essai). Or, les glycyl-peptides et le glutathion fournissent des résultats nettement supérieurs qui ne peuvent provenir que d'une hydrolyse de la liaison peptidique.

L'hydrolyse des peptides par différents réactifs et ses rapports avec leur structure font l'objet de recherches actuellement en cours au laboratoire de Chimie Biologique. Nous n'insisterons donc pas sur ces faits que nous voulions seulement signaler.

3° *Composés azotés divers.*

L'asparagine est en grande partie désaminée par la chloramine ce qui est tout à fait normal puisqu'elle possède un groupement α -aminé α -carboxylique.

TABLEAU XIII

		Acide nitreux	Chloro- mine T	Ninhydrine		Per- manga- nate de K
				1	2	
Acides aminés non α -aminés	β -alanine	100	4,0	2,5	8,0	62
	Acide β -amino butyrique	100	1,0	2,0	8,0	51,5
	Acide ε -amino caproïque	58	2,0	1,0	6,0	45
	Taurine	100	0	0	0	58,5
Peptides	Acide hippurique	—	0	0	0	0
	Glycyl-glycine	144	51,3	91	53	84,5
	Glycyl-leucine	165	38,5	74	85	83
	Glycyl-tyrosine	145	40,5	93	47,5	31,5
	Diglycylglycine	128	50,5	92,5	54	74,5
	Leucyl-glycine	102	7,5	2,0	0	86,5
	Leucyl-tyrosine	95	5,8	2,0	0	14,5
	Leucyl-glycyl-glycine	104	10,5	9,0	6,0	87,5
	Glutathion	260	44	86	84	69
	Dicétopipérazine	4	5	10	4,0	16,5
Divers	Peptone de Witte	—	2,5	2,0	11,5	9,5
	Asparagine	100	55,5	71	72	15
	Glutamine	—	—	—	—	—
	Glucosamine	—	20	7,0	6,0	42,5
	Sarcosine	—	9	60,0	21,5	76
	Urée	—	0,5	2,5	10,5	0
	Créatine	—	0	2,0	7,5	1,5
	Créatinine	—	0	5,0	6,0	0
	Acide urique	—	0	0	9,0	3,5
	Acide para-aminobenzoïque	0	0	2,0	5,0	27,5
	Acide ortho-aminobenzoïque	6	0	3,0	7,0	19,5
	Acide méta-aminobenzoïque	3	0	3,0	2,5	21,5
	Acide para-amino salicylique	100	0	1,0	7,5	10,0

1. L'excès de ninhydrine est précipité par S H_2 .
2. L'excès de ninhydrine est éliminé par $\text{H}_2 \text{O}_2$.

Quant à la sarcosine ou méthyl-glycine, on peut envisager que la décarboxylation la transforme partiellement en diméthylamine, base volatile entraînable par aération en milieu alcalin et donc dosable acidimétriquement.

Nous avons d'autre part étudié comparativement l'acide para-amino-salicylique et les acides ortho, meta et para-amino-benzoïque,

étude justifiée par l'emploi de l'acide para-amino-salicylique dans la chimiothérapie antituberculeuse et par la présence d'acide para-amino-benzoïque dans l'acide folique.

Il résulte des chiffres obtenus (Tableau XIII) que la chloramine ne désamine aucun de ces composés, la ninhydrine pratiquement pas, le permanganate de potassium donne des résultats irréguliers.

Quant à l'acide nitreux il désamine en totalité l'acide para-amino-salicylique mais respecte intégralement les acides ortho, meta et para-amino-benzoïque.

On peut d'ores et déjà penser que la présence du groupement phénol de l'acide para-amino-salicylique est responsable de ce fait.

Remarquons en outre que la présence de ces composés en quantité non négligeable dans le sérum constitue une importante cause d'erreur si on utilise, par exemple, la méthode colorimétrique de FOLIN [20] au β -naphtoquinone sulfonate de sodium qui "marche" en quelque sorte trop bien avec ces composés.

Voici en effet, les résultats obtenus avec une prise d'essai de 1 m. d'azote aminé dosé colorimétriquement par rapport à un étalon effectug selon FRAME [21] avec un mélange de glycocolle et d'acide glutamique

	Prise d'essai théorique	Dosé par comparaison avec l'étalon
Acide para-amino-salicylique	1 mg	1,43 mg
Acide para-amino-benzoïque	1 mg	1,43 mg
Acide méta-amino-benzoïque	1 mg	1,33 mg
Acide ortho-amino-benzoïque	1 mg	1,82 mg

Il résulte des considérations précédentes que seulement deux méthodes peuvent être considérées comme relativement spécifiques du dosage de l'azote α -aminé : ce sont les désaminations par la chloramine T et la désamination par la ninhydrine.

*
* *

Outre la spécificité de la réaction vis-à-vis des acides aminés, l'application aux milieux biologiques et au sang en particulier de l'une ou l'autre de ces deux méthodes suppose :

— Qu'elle est applicable aux acides α -aminés aux faibles doses où ils se trouvent dans le plasma sanguin notamment.

— Qu'elle est applicable en présence d'un désalbuminant.

— Que son exécution est suffisamment simple pour se prêter à des dosages en série.

CHAPITRE VI

APPLICATION DE LA DÉSAMINATION PAR LA CHLORAMINE T ET LA NINHYDRINE AUX MILIEUX BIOLOGIQUES

A — Influence de la concentration en azote aminé

Les acides aminés ont été désaminés d'une part par la chloramine d'autre part par la ninhydrine avec des prises d'essai respectivement égales à 100 γ , 200 γ , et 1.000 γ . (Tableau XIV).

Généralement, plus la prise d'essai en azote aminé est faible meilleur est le rendement, de sorte qu'aux basses concentrations des acides aminés dans le sang, la désamination peut être considérée comme très satisfaisante.

B — Désamination des acides aminés en solution en présence d'un désalbuminant

Cette étude a été faite dans les conditions suivantes : une prise d'essai de 100 ou 200 γ en azote aminé contenue dans un volume de solution de 1 ou 2 cm³ a été désaminée par la chloramine en présence de 1 cm³ de :

- solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100,
- solution d'acide tungstique à 5p. 100 (0,5 cm³ de tungstate de Na à 10 p. 100 + 0,5 cm³ d'acide sulfurique 2/3 N).
- solution d'acide lutéo-phosphotungstique à 5 p. 100 (0,5 cm³ de lutéo-phosphotungstate de Na à 10 p. 100 + 0,5 cm³ d'acide sulfurique 2/3 N).

Nous avons adopté ces conditions expérimentales qui sont pratiquement celles des désalbuminations sanguines dont nous parlons plus loin.

Tous les résultats sont groupés en deux tableaux (tableau XV pour des prises d'essai en azote aminé de 100 γ et XVI pour des prises d'essai de 200 γ).

Dans chacun des deux tableaux sont également mentionnés les résultats obtenus en solution pure c'est-à-dire en l'absence de tout désalbuminant.

Une première constatation générale est possible : les pourcentages de désamination obtenus en présence de désalbuminant sont très légèrement inférieurs à ceux que l'on obtient en solution pure mais les différences sont suffisamment faibles (5 à 10 p. 100 en général) pour qu'on puisse ne pas en tenir compte pour des recherches biologiques.

TABLEAU XIV

		Chloramine T			Ninhydrine H ₂ O ₂		
		100 γ	200 γ	1.000 γ	100 γ	200 μ	1.000 γ
Mono-amino-Mono-acides à chaîne linéaire	Glycine	47,5	39,0	40,5	82,5	68,75	91
	Alanine	100	99	94	100	85	81,5
	Acide α-amino butyrique	90	90	96	92,5	93,75	90
	Norvaline	90	92,5	100	87,5	87,5	95
	Norleucine	100	100	99	95	92,5	87
Mono-amino-Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	100	100	100	95	87,5	94,8
	Leucine	100	97,5	96,5	97,5	92,5	91
	Isoleucine	100	100	100	97	85	95
	Isovaline	90	85	95	—	—	16,5
Mono-amino-Mono-acides hydroxylés et soufrés	Sérine	92,5	88,7	92	92,5	87,5	99
	Thréonine	92,5	90	53	97,5	83,75	90,5
	Cystéine	70	60	45,5	100	87,5	54
	Cystine	80	61,25	53	100	83,75	58
	Méthionine	95,0	96,5	85	82,5	72,25	92
	Lanthionine	100	100	35	—	—	54
	Acide djenkolique	57	50	46	—	—	69
Mono-amino-Diacides	Acide aspartique	85	82,5	87	100	87,5	83
	Acides glutamique	100	100	92,5	100	92,5	89,5
Acides Diaminés	Ornithine	—	52,5	40,7	58,5	56	52,5
	Lysine	100	85	95	77,5	60	106
Acides aminés cycliques	Phényl-glycine	100	100	86	—	—	100
	Phényl-alanine	100	100	90	100	82,5	87,5
	Tyrosine	60	62,5	87,2	100	100	66
	Mono-bromo-tyrosine	100	95	—	—	—	—
	Dibromo-tyrosine	100	91,25	91	—	—	101
	Monoiodo-tyrosine	—	—	—	—	—	—
	Di-iodo-tyrosine	82,5	88,75	86,2	100	100	66,5
	Histidine	80	88	88,75	110	140	100
	Proline	60	62,5	68	40	43,75	27,5
	Tryptophane	100	95	113	57,5	81,5	44
Acides β et ω aminés	Dioxy-phényl-alanine	37,5	35	58,5	87,5	91,25	68
	β-alanine	5,0	5,0	4,0	—	—	9,0
	Acides-β-amino butyrique	5,0	6,5	1,0	—	—	8,0
	Acide ε-amino caproïque	—	3,75	2,0	—	—	6,0
Guanidino amino acide	Arginine	87,5	93,5	94,5	95	72,5	80

Les résultats expriment les pourcentages d'azote aminé obtenus pour des prises d'essai de 100, 200 et 1.000 γ d'azote-aminé.

D'autre part, c'est surtout en présence d'acide trichloracétique que les résultats obtenus sont les plus faibles. Il est possible que ce fait soit dû à une réduction de la chloramine T par ce composé ce qui diminuerait la concentration du réactif désaminant et du même coup l'intensité de la désamination.

Enfin, l'influence des acides tungstique et lutéophosphotungstique est pratiquement la même.

C — Désamination par la chloramine et la ninhydrine et teneur du plasma en acides aminés

Par des méthodes microbiologiques ou par des méthodes chimiques sensibles et spécifiques, on a pu doser individuellement un nombre assez élevé d'acides aminés dans le sang.

Les résultats de ces dosages sont indiqués dans la première colonne du tableau XVII d'après KREBS [22] au travail duquel il faut se reporter pour les indications bibliographiques des techniques utilisées.

Nous avons indiqué dans la deuxième colonne les pourcentages d'azote α -aminé correspondant. En totalisant ces nombres on arrive à une teneur globale du plasma en azote α -aminé égale à 39,06 mg.

Or VAN SLYKE [23] en dosant sur le plasma le CO_2 des acides aminés dégagé par la ninhydrine obtient un résultat en azote α -aminé égal à 41 mg.

La concordance entre ces deux nombres prouve que la désamination par la ninhydrine est correcte et peut être prise comme méthode de référence pour le sang normal.

Nous pouvons alors calculer pour chaque acide aminé le pourcentage d'azote obtenu avec la chloramine T par rapport aux chiffres fournis par la ninhydrine, moyennant les résultats indiqués au chapitre précédent.

Nous considérons comme méthode de référence le cas où l'excès de ninhydrine est éliminé par l'hydrogène sulfuré, ce qui nous permet de calculer également les pourcentages obtenus si l'excès de ninhydrine est éliminé par l'eau oxygénée.

La citrulline et la glutamine ne figurent pas dans l'azote aminé dosé, car nous n'avons pu nous procurer ces produits.

Le tableau XVII entraîne les remarques suivantes :

1^o En totalisant l'azote aminé dosé par la chloramine T et la ninhydrine (H_2O_2) par rapport à la méthode à la ninhydrine (S H_2) on obtient respectivement 34,11 mg et 32,18 mg, compte non tenu de l'azote de la citrulline et de la glutamine.

2^o la part de la glutamine est importante dans la constitution de l'azote α -aminé du plasma (14 à 15 p. 100 environ). N'ayant pas ce

TABLEAU XV

		Chloramine T				Ninhydrine H ₂ O ₂			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Mono-amino Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	47,5	45,0	38,5	40,0	82,5	72,5	70	90
	Alanine	100	85	87,5	85	100	100	100	100
	Acide α-amino buty- rique	90	85	90	90	92,5	100	90	97,5
	Norvaline	90	87,5	80,0	80,0	87,5	85	80	90
	Norleucine	100	95,9	89,2	91,5	95	95	95	87,5
Mono-amino Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	100	90	92,5	90,0	95	65	95	100
	Leucine	100	95	100	100	97,5	95	100	100
	Isoleucine	100	100	92	87,5	97,5	87,5	97,5	100
Mono-amino Mono-acides hydroxylés et Soufrés	Sérine	92,5	75	85	80	92,5	92,5	85	90,0
	Cystéine	70	57,5	70	65	100	72,5	65,0	70,0
	Cystine	80	67,5	60	57,5	100	77,5	50	67,5
	Méthionine	95	90	95	95	82,5	80	80	80
	Thréonine	92,5	90	90	90	97,5	85	75	92,5
	Lanthionine	100	85	97,5	92,5	—	—	—	—
	Acide djenkolique	57,5	40	62,5	62,5	—	—	—	—
Mono-amino Diacides	Acide aspartique	85	82,5	85	87,5	100	100	90	100
	Acide glutamique	100	95	92,5	92,5	100	62,5	90	95
Acides Dia- minés	Ornithine	—	—	—	—	117,5	105	117,5	117,5
	Lysine	—	—	—	—	—	—	—	—
Acides β et ω aminés	β-alanine	5,0	—	—	—	—	—	—	—
	Acide β-amino-buty- rique	5	5	2,5	5	—	—	—	—
	Acide ε-amino-ca- proïque	—	—	—	—	—	—	—	—
Acides α-aminés α-substitués	Isovaline	90	82,5	85	80	—	—	—	—
Acides aminés cycliques	Phényl-glycine	100	95	95	90	—	—	—	—
	Phényl-alanine	100	85	85	87,5	100	67,5	77,5	100
	Tyrosine	60	100	92,5	95	100	77,5	90,0	100
	Histidine	80	75	77,5	75	110	95	104	117,5
	Proline	60	60	70	62,5	40	17,5	25,0	25,0
	Tryptophane	100	80	80	82,5	57,5	75	87,5	77,5
	Dioxy-phényl-alanine	37,5	57,5	62,5	—	—	—	—	—
Acides ami- nés aromatiques halogénés	Di-iodo-tyrosine	82,5	72,5	82,5	—	100	87,25	95	97,5
	Mono-bromo-tyrosine	100	82,5	87,5	70,0	—	—	—	—
	Dibromotyrosine	100	87,5	90	90	—	—	—	—

TABLEAU XV (Suite)

		Chloramine T				Ninhydrine H ₂ O ₂			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Guanidino-amino acide	Arginine	87,5	67,5	82,5	85	95	90	77,5	95
Peptides	Acide hippurique	—	—	—	—	—	—	—	—
	Glycyl-Glycine	75,	80	87,5	87,5	90	112,5	100	100
	Glycyl-leucine	65	70	75	67,5	—	—	—	—
	Glycyl-tyrosine	85	92,5	90	90	—	—	—	—
	Diglycylglycine	95	95	100	100	70	100	87,5	100
Divers	Asparagine	45	55	52,5	52,5	—	—	—	—
	Glucosamine	20	10	25	15	—	—	—	—
	Sarcosine	17,5	5	10	10	—	—	—	—

0 = Acide aminé en solution pure

1 = Acide aminé + acide trichloracétique à 10 %

2 = Acide aminé + acide tungstique à 5 %

3 = Acide aminé + acide lutéo-phosphotungstique à 5 %

Les nombres expriment les pourcentages d'azote α -aminé obtenu pour une prise d'essai de 100 γ .

composé à notre disposition, nous avons essayé l'action de la chloramine et de la ninhydrine sur l'asparagine qui livre environ 70 p. 100 de son azote aminé dans les conditions expérimentales utilisées.

Si l'on tient compte du fait que l'acide aspartique est moins désaminé que l'acide glutamique et si on établit un parallélisme à priori possible entre le comportement de chacun de ces acides et l'amide qui lui correspond, on peut penser que la majeure partie de la glutamine est désaminée par ces réactifs.

En ajoutant l'azote α -aminé des 57,8 mg de glutamine du plasma. (soit 5,49 mg.) et celui des 5 mg de citrulline (soit 0,4 mg.) on obtient comme azote α -aminé dosé par la ninhydrine H₂O₂ 32,18 + 5,89 = 38,07 mg. et par la chloramine 34,11 + 5,89 = 40,00 mg.

3° Comme nous l'avons déjà souligné, le glycocolle ne livre pas plus de la moitié de son azote sous l'action de la chloramine, mais le tableau XVII nous montre la faible proportion du glycocolle dans l'azote aminé sanguin (8 p. 100 d'après les recherches de GUTMAN et ALEXANDER [24] l'erreur ainsi faite est de l'ordre de 4 p. 100, c'est-à-dire pratiquement négligeable.

Remarquons enfin que l'azote aminé du plasma dosé par l'acide nitreux est de 44 mg, ce qui est dû, comme nous l'avons déjà souligné, au peu de spécificité de cette méthode qui ne dose pas que l'azote α -aminé.

TABLEAU XVI

		Chloramine T				Ninhydrine H ₂ O ₂			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Mono-amino- Mono-acides à chaîne linéaire	Glycocolle	39,0	39,0	38,0	25,0	68,75	70	70	76,25
	Alanine	99	89	95	97,5	85	77,5	90	90
	Acide α-amino butyrique	90	88,7	90	83,7	93,75	90	97,5	96,25
	Norvaline	92,5	87,5	80,2	87,7	87,5	87,5	82,5	86,25
	Norleucine	100	100	95,1	94	92,5	77,5	82,5	85
Mono-amino- Mono-acides à chaîne ramifiée	Valine	100	87,5	97,5	90	87,5	85	80	95
	Leucine	97,5	88,8	92,5	100	92,5	67,5	85	95
	Isoleucine	100	91	92,5	93,7	85	86,25	81,9	91,25
Mono-amino Mono- acides hydroxy- lés et soufrés	Sérine	88,7	80	80	78,7	87,5	68,75	75	90
	Cystéine	60	60	58,7	55	87,5	50	56,25	87,5
	Cystine	61,25	58,75	61,25	57,5	83,75	55	53,75	53,75
	Méthionine	96,5	90	96,25	96,25	72,25	68,75	71,25	77,50
	Thréonine	90	85	90	85	83,75	75	68,5	81,25
	Lanthionine	100	96,25	98,75	97,5	—	—	—	—
	Acide djenkolique	50	48,75	50	50	—	—	—	—
Mono-amino Di- acides	Acide aspartique	82,5	82,5	83,75	85	100	87,5	97,5	100
	Acide glutamique	100	87,5	96,25	96,25	92,5	82,5	76	85
Acide Diaminés	Ornithine	52,5	—	—	—	112,5	65	93,75	100
	Lysine	—	—	—	—	—	—	—	—
Acides α-aminés α-substitués	Isovaline	85	81,25	80	75	—	—	—	—
Acides β et ω aminés	β-alanine	5,0	4,1	8,2	—	—	—	—	—
	Acide β-amino butyrique	6,25	3,75	5	3,75	—	—	—	—
	Acide ε-amino caproïque	3,75	2,50	2,5	2,50	—	—	—	—

TABLEAU XVI (Suite)

		Chloramine T				Ninhydrine H ₂ O ₂			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Acides aminés cycliques	Phényl-glycine	100	93,75	91,25	90	—	—	—	—
	Phényl-alanine	100	95	92,5	92,5	82,5	53,75	58,75	63,75
	Tyrosine	62,5	75	82,5	82,5	100	51,25	87,5	100
	Histidine	88,75	83,75	77,5	75	140	87,5	111,5	150
	Proline	62,5	50	62,5	52,5	43,75	22,5	33,75	35
	Tryptophane	95	91,5	95	90	81,5	75,75	93,75	100
Acides aminés aromatiques halogénés	Dioxy-phényl-alanine	35	60	65	43,75	—	—	—	—
	Diiodo-tyrosine	88,75	81,25	90	85	100	91,25	95	100
	Monobromo-tyrosine	95	90	87,5	78,5	—	—	—	—
	Dibromo-tyrosine	91,25	87,5	91,25	87,5	—	—	—	—
Guanidino amino-acide	Arginine	93,5	75	82,5	93,75	72,5	68,75	71,25	77,5
Peptides	Acide hippurique	6,25	2,5	2,5	3,5	—	—	—	—
	Glycyl-glycine	56,25	71,25	77,5	76,25	57,25	107,5	100	102,5
	Glycyl leucine	71,25	72,5	72,5	60	—	—	—	—
	Glycyl tyrosine	75	81,25	71,25	71,25	—	—	—	—
	Diglycyl glycine	78,75	83,75	83,75	75	68,75	—	75	100
Divers	Asparagine	—	—	—	—	—	—	—	—
	Glucosamine	20	21,25	16,25	22,5	—	—	—	—
	Sarcosine	6,25	3,75	6,25	6,25	—	—	—	—

0 — Acide aminé en solution pure

1 = Acide aminé + acide trichloracétique à 10 %

2 = Acide aminé + acide tungstique à 5 %

3 = Acide aminé + acide lutéo-phosphotungstique à 5 %

Les nombres expriment les pourcentages d'azote α-aminé obtenus pour une prise d'essai de 200 γ.

TABLEAU XVII

	Acides aminés du plasma en mg par litre (Krebs)	Azote α -aminé du plasma en mg par litre (Krebs)	Azote α -aminé dosé par		
			La ninhydrine (H ₂ S)	La ninhydrine (H ₂ O ₂)	La chloramine
Glycocolle	17,7	3,3	3,3	3,3	1,65
Alanine	39,7	6,24	6,24	5,92	6,11
Valine	28,3	4,38	4,38	4,38	4,64
Leucine	19,1	2,04	2,04	2,14	2,30
Isoleucine	16,0	1,71	1,71	1,70	1,78
Arginine	23,4	1,88	1,88	—	1,86
Citrulline	5,0	0,4	—	—	—
Acide glutamique	34,1	3,23	2,23	2,91	3,07
Glutamine	57,8	5,49	—	—	—
Histidine	14,2	1,27	1,27	1,55	1,32
Lysine	29,5	2,82	2,82	3,11	2,82
Méthionine	8,5	0,80	0,80	0,81	0,75
Phénylalanine	13,8	1,17	1,17	1,87	2,01
Thréonine	20,2	2,37	2,37	2,13	1,66
Tryptophane	10,8	0,74	0,74	0,93	2,22
Tyrosine	14,8	1,22	1,22	1,43	1,92
TOTAL		39,06	33,17	32,18	34,11

Composition moyenne du sang en acides aminés.

D — Choix d'une méthode de dosage de l'azote aminé du plasma

Le choix d'une telle méthode comporte :

1^o le choix d'un désalbuminant qui élimine au maximum les composés azotés susceptibles de fausser le dosage,

2^o l'emploi d'une technique de réalisation aussi simple que possible et applicable à des recherches en série.

Nous avons finalement adopté, comme désalbuminant, l'acide tungstique, et comme agent de désamination, la chloramine T.

Nous donnons ci-dessous une description complète du protocole expérimental que nous justifierons ensuite.

I. — TECHNIQUE DÉTAILLÉE DU DOSAGE DE L'AZOTE α -AMINÉ DU PLASMA

1^o *Désalbumination* : 5 cm³ de sérum ou de plasma sont additionnés successivement de :

- 10 cm³ d'eau,
- 5 cm³ de tungstate de Na à 10 p. 100,
- 5 cm³ d'acide sulfurique 2/3 N ;

en mélangeant après chaque addition de réactif, on filtre et le dosage sera effectué sur 10 cm³ de filtrat correspondant à 2 cm³ de sérum ou de plasma.

2° *Appareillage et technique* : L'appareillage est celui indiqué au chapitre III.

Les 10 cm³ de filtrat tungstique placés dans le tube de Violette B sont neutralisés avec une solution à 40 p. 100 de carbonate de soude en présence de phénol phtaléine, on ajoute ensuite 0,5 cm³ de solution de carbonate de sodium cristallisé à 10 p. 100 et un petit copeau de paraffine.

Dans le tube de Violette C, on introduit 5 cm³ de solution d'acide borique à 4 p. 100 selon MERKER et WAGNER [15]. Divers essais nous ont montré que cet acide fixe intégralement l'ammoniac malgré sa dissociation négligeable (1). On ajoute 3 gouttes de solution alcoolique saturée de rouge de méthyle.

Le tube C est mis en place, le bain-marie porté à 70° et la burette E, remplie d'acide sulfurique N/280.

Tout l'appareillage étant ainsi préparé, on introduit rapidement dans le tube B, 1 cm³ de solution récemment préparée de chloramine T à 10 p. 100 ; le tube est solidement adapté à son bouchon, plongé dans le bain-marie et on établit l'aspiration par la trompe F pendant 15 min.

La coloration du tube C a, en général, pris une teinte orangée tirant d'autant plus sur le jaune que le dégagement d'ammoniac a été plus abondant.

Au moyen de la burette, on rétablit la coloration initiale de l'indicateur, en s'aidant de légères aspirations qui assurent le brassage du liquide et rendent la couleur homogène.

Toutefois, le virage en présence d'acide borique est moins net que dans l'eau pure, aussi pour augmenter la précision du dosage, nous comparons la coloration obtenue à celle d'un tube témoin contenant 5 cm³ d'acide borique à 4 p. 100 et 3 gouttes de rouge de méthyle portés au même volume que le liquide contenu dans le tube C, par addition d'eau distillée.

On verse la solution d'acide sulfurique N/280 dans le tube C jusqu'à égalité de teinte avec le témoin.

3° *Calcul du résultat* : Soit n , le nombre de cm³ versés d'acide sulfurique N/280. Ils correspondent à $n \times 0,05$ mg. d'azote contenu dans la prise d'essai (2 cm³ de sérum) d'où : azote aminé en mg par litre = $n \times 25$.

(1) Ce procédé permet d'éviter une surveillance constante pendant le dégagement de l'ammoniac qui, fixé, ne nécessite pas une neutralisation au fur et à mesure de son apparition.

La lecture du virage de l'indicateur ne cause pas une erreur supérieure à 2 gouttes d'acide sulfurique N/280 soit 2/20 de cm³ environ.

$$\text{D'où le résultat en mg par litre} = (n \pm \frac{2}{20}) \times 25$$

$$= n \times 25 \pm 2,5 \text{ mg.}$$

Si l'on admet une teneur moyenne du plasma de 40 à 50 mg d'azote α -aminé, l'erreur faite par cette technique est de l'ordre de 5 p. 100.

II. — JUSTIFICATION DU CHOIX DE L'ACIDE TUNGSTIQUE COMME DÉSALBUMINANT

a) Nous avons comparé dans le tableau XVIII :

— Les résultats obtenus par désamination à la chloramine après désalbumination tungstique telle que nous venons de l'indiquer

— Ceux obtenus par désamination à la chloramine après la désalbumination trichloracétique selon MOOG (volumes égaux de sérum et d'acide trichloracétique à 20 p. 100)

— Enfin, ceux obtenus par la méthode colorimétrique de FOLIN au β -naphthoquinone sulfonate de Na.

On déduit de ces chiffres que :

1^o C'est la méthode de FOLIN qui donne les résultats les plus élevés. Ce fait est aisément explicable puisque, comme nous l'avons vu, le dosage selon FOLIN n'est pas rigoureusement spécifique de l'azote α -aminé.

2^o Le filtrat trichloracétique fournit des résultats plus élevés que le filtrat tungstique.

Ce fait est dû à l'existence de peptides dans le filtrat trichloracétique ; or, nous avons vu dans le chapitre précédent, que ces composés (surtout les glycy-peptides) sont hydrolysés par la chloramine et par suite partiellement désaminés.

b) Afin de fixer définitivement notre choix, nous avons, dans une seconde série d'expérience, comparé les taux d'azote fournis par la chloramine dans les trois filtrats : trichloracétique, tungstique, et lutéophophostungstique (Désalbumination selon la méthode de Paul CRISTOL).

Cette étude comparative est rassemblée dans le tableau XIX.

On voit, en comparant les moyennes des résultats, que les résultats les plus bas sont ceux obtenus après désalbumination tungstique. C'est donc celle-là que nous avons adoptée.

TABLEAU XVIII

DIAGNOSTICS	Azote aminé en mg par litre de sérum		
	Filtrat tungstique	Filtrat trichloracétique	Méthode de Folin
Sclérose cardiopulmonaire	40	42	44
Sclérose cardiovasculaire	25	38	40
Hypertension	30	40	—
Hypertension	20	30	44
Hypertension	26	32	30
Hypertension	45	56	66
Hypertension	31	41	50
Asystolie	30	37	43
Sclérose pulmonaire	83	87	73
Rétrécissement mitral	23	32	36
Pseudoasthme cardiaque	40	36	53
Cardiopathie	32	35	—
Mélitococcie	24	39	44
Rhumatisme articulaire aigu	45	75	57
Rhumatisme articulaire aigu	52	62	61
Douleurs articulaires	31	37	—
Bronchopneumonie	48	48	55
Néphrite	—	40	35
Néphrite	30	46	30
Cirrhose	29	40	47
Insuffisance hépatique	—	43	—
Phlegmon diffus du périnée	14	24	15
Phlegmon diffus du périnée	25	35	58
Phlegmon diffus du périnée	17	26	28
Phlegmon diffus du périnée	34	50	—
Phlegmon diffus du périnée	38	50	—
Phlegmon diffus du périnée	45	64	62
Phlegmon diffus du périnée	30	36	40
Diabète	27	39	—
Diabète	23	31	33
Diabète	51	46	66
Diabète	35	35	—
Diabète	—	45	—
Diabète	33	—	—
Néphrite aiguë	37	37	44
Toxicose	—	40	—
Toxicose	—	32	—
Néphrite aiguë	46	57	—
Moyenne	34	43	46

III. — JUSTIFICATION DU CHOIX DE LA CHLORAMINE T COMME RÉACTIF DÉSAMINANT

1° La technique de dosage que nous avons décrite est beaucoup plus simple que la méthode à la ninhydrine qui comporte toujours au moins deux temps : la désamination proprement dite et le dosage de l'ammoniac libéré. A ces deux opérations, il faut ajouter, l'élimination de l'excès de ninhydrine qui, nous l'avons vu, est une opération longue et délicate si l'on emploie l'hydrogène sulfuré.

TABLEAU XIX

DIAGNOSTICS	Azote aminé en mg par litre de sérum		
	Filtrat tungstique	Filtrat P W	Filtrat CCl ₃ — COOH
Néphrite hypertensive	45	47,5	50
Néphrite	60	55	62,5
Arthrite	37,5	38,7	42,5
Polyarthrite	33,7	62,5	40
Cirrhose	40	—	47,5
Sclérodermie	—	47,5	53,7
Brûlure	48,7	47,5	52,5
Kala azar	65	62,5	50
Kala azar	58,7	58,7	62,5
Kala azar	60	57,5	65
Néo du petit bassin	37,5	45	43,7
Cancer de l'utérus	43,7	38,5	38,7
Cancer du sein	45	46	55
Réticulo sarcome	40	36,2	43,7
Séminome	42,5	41,2	46,2
Cancer du sein	42,5	—	50
Cancer de l'estomac	37,5	41,2	43,7
Cancer du col utérin	47,5	43,7	47,5
Moyenne	45,8	47,4	49,9

P W = Phosphotungstique

CCl₃ — COOH = Trichloracétique

La méthode plus simple de SOBEL [25] consiste à ajouter au liquide, après désamination, 3 gouttes d'eau oxygénée et 1 cm³ de potasse saturée nécessaire d'après l'auteur pour un entraînement complet de l'ammoniac.

Nous avons, quant à nous, toujours employé 0,5 cm³ de carbonate de soude à 40 p. 100 puisque nous avons montré qu'une telle alcalinité entraîne un déplacement complet de l'ammoniac.

Nous avons montré dans un chapitre précédent que, malgré quelques divergences, la plupart des acides aminés se comportent de façon analogue.

L'élimination de l'excès de ninhydrine par l'eau oxygénée est d'une réalisation beaucoup plus rapide que la méthode à l'hydrogène sulfuré mais paraît moins sûre car la précipitation sous forme d'hydrindantine élimine, au sens propre du mot, la ninhydrine du champ de réaction.

Quoiqu'il en soit, la méthode à la ninhydrine ne peut être une méthode applicable à des recherches en série, son exécution est beaucoup trop longue et minutieuse.

2° Outre la simplicité, la méthode à la chloramine T présente sur celle à la ninhydrine une supériorité de principe ; la chloramine hydrolyse moins les peptides que ne le fait la ninhydrine. Or, on sait que des oligo-peptides peuvent exister dans tous les filtrats de désalbumination y compris les filtrats tungstiques surtout chez des malades présentant une hyperpolypeptidémie ; on peut donc s'attendre, dans ces cas, à trouver par la méthode à la ninhydrine un résultat plus élevé que par la méthode à la chloramine.

Nous avons effectué les dosages par les deux méthodes.

1° Chez des cancéreux,

2° Chez quelques diabétiques.

1° Parmi les nombreux dosages effectués chez les sujets porteurs d'un cancer, nous avons indiqué dans le tableau XX, les cas pour lesquels nous avons pu doser d'une part l'azote aminé par les deux méthodes à la chloramine et à la ninhydrine, d'autre part, l'azote polypeptidique par la méthode de double azote de Paul CRISTOL.

On peut en déduire que :

1° Il y a en général parallélisme entre les résultats obtenus par les deux méthodes de désamination, mais ceux fournis par la ninhydrine sont toujours plus élevés et dans d'importantes proportions.

2° Si l'on fait la moyenne des différents chiffres obtenus, on trouve comme amino-acidémie moyenne dosée par la chloramine : 33 mg, comme amino acidémie moyenne dosée par la ninhydrine : 50 mg.

Le taux d'azote aminé-chloramine est donc en moyenne pratiquement normal alors que le taux d'azote aminé - ninhydrine est supérieur aux résultats trouvés par VAN SLYKE [23] dans le plasma de sujets normaux (41 mg).

3° La valeur moyenne de l'azote peptidique chez les malades étudiés est égale à 43 mg par litre, soit nettement supérieure aux chiffres normaux habituels (20 mg par litre). Il semble donc qu'on puisse faire un rapprochement entre cette hyperpolypeptidémie et la différence relativement importante des taux d'azote aminé dosé par les deux méthodes.

TABLEAU XX

DIAGNOSTICS	Poly-peptides en mg par litre de sérum	Azote aminé en mg par litre dosé par	
		Chloramine	Ninhydrine
Cancer du sein	22	31	41
Cancer du sein après opération	72	30	47,5
avant opération	—	35	50
Cancer du sein	60	35	59
Tumeur du sein 1 ^{er} dosage	22	30	41
2 ^{me} dosage	48	25	40
Cancer du col	42	21	31
Cancer du col	50	25	66
Cancer du col	48	40	72,5
Cancer généralisé des ovaires 1 ^{er} dosage	70	40	45
2 ^{me} dosage	50	36	64
Épithélioma du rectum	24	29	40
Néo du rectum (récidive)	64	34	42
Métastase ganglionnaire	54	37,5	45
Métastase ganglionnaire 1 ^{er} dosage	36	27,5	47,5
2 ^{me} dosage	26	31	65
Épithélioma œsophage	20	35	51
Cancer du poumon	32	37,5	75
Ostéochondrome	40	30	44
Tumeur à myéloplaxes 1 ^{er} dosage	30	36	57,5
2 ^{me} dosage	26	32,5	40
Tumeur du genou	40	32,5	46
Cancer du genou	62	31	41
Moyenne	43	33	50

Il va sans dire qu'on ne peut s'attendre à trouver cette différence équivalente à l'azote peptidique puisque, comme nous l'avons déjà indiqué :

- tous les peptides ne sont pas dosés par la ninhydrine ;
- ceux qui le sont ne le sont pas en totalité ;
- enfin la chloramine elle-aussi libère un peu d'azote peptidique.

Néanmoins, on peut dire qu'en général, plus la peptidémie sera élevée, plus grande sera la différence entre les résultats fournis par la ninhydrine et ceux fournis par la chloramine.

Il est donc important de disposer pour le dosage de l'azote aminé du plasma, d'une méthode aussi spécifique que possible afin de ne pas appeler par exemple hyperaminoacidémie ce qui n'est qu'une hyperpoly-peptidémie.

2° C'est un phénomène du même ordre que nous retrouvons en dosant l'azote aminé dans le plasma de quelques diabétiques pour lesquels malheureusement des prélèvements insuffisants ont empêché l'évaluation de l'azote peptidique.

Le tableau XXI souligne encore la très nette différence entre les résultats fournis par les 2 méthodes. Il montre en outre, malgré le nombre restreint des cas, que l'amino-acidémie des diabétiques peut être normale.

TABLEAU XXI

Sérums Diabétiques	Azote aminé en mg par litre de sérum	
	Chloramine T	Ninhydrine
Sérum n° 1 1 ^{er} dosage	32,50	—
2 ^{me} dosage	31	46
Sérum n° 2 1 ^{er} dosage	32,5	—
2 ^{me} dosage	36	41
Sérum n° 3 1 ^{er} dosage	37,5	—
2 ^{me} dosage	27,5	42,5
Sérum n° 4	20	—
Sérum n° 5	35	—
Moyenne	31,5	43

Ce fait n'a rien de surprenant car si le manque d'insuline augmente l'azote aminé sanguin, les diabétiques équilibrés en ont toujours une quantité suffisante à leur disposition pour régulariser le métabolisme azoté ; et cela est en parfait accord avec les recherches de MACABIES sur les chiens en état de diabète atténué.

Les considérations précédentes démontrent l'incontestable supériorité de la désamination par la chloramine T comme méthode applicable au plasma.

Nous en avons longuement justifié le principe en montrant qu'elle est à la fois suffisamment précise et suffisamment spécifique ; sa réalisation est simple, rapide, accessible à des dosages en série.

De toutes les méthodes étudiées, c'est la seule qui présente ces avantages, nous n'hésitons pas à la conseiller.

Remarquons enfin que bien des travaux sur la physiopathologie de l'aminocidémie gagneraient à être revus avec une méthode correcte de dosage ; et de toutes manières, l'interprétation des résultats serait certainement facilitée par l'indication de la technique analytique adoptée.

E — Application de la désamination par la chloramine T à l'étude des urines

On emploie couramment en clinique la détermination de l'azote formol c'est-à-dire, en fait, la somme de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé. Nous allons voir que la méthode à la chloramine permet, sur une même prise d'essai, de doser séparément chacun de ces deux constituants. Si, en effet, on introduit dans le tube B un filtrat d'urine alcalinisée par une solution saturée de carbonate de lithium en l'absence de chloramine, sous l'action du courant d'air à 70° il y a entraînement de l'ammoniac que l'on dose comme nous l'avons indiqué.

Au filtrat ainsi débarrassé de son ammoniac, ajoutons 1 cm³ de solution de chloramine T ; on provoque la désamination des acides α -aminés d'où nouvelle libération d'ammoniac que l'on dose de même.

TABLEAU XXII

Diagnostics	Albumine	Azote formol		Filtrat trichloracétique		
		Urine	Filtr. tri.	N NH ₃	N aminé	N HN ₃ + Naminé
	1,8	0,26	0,21	0,093	0,101	0,194
Hypertension	0,5	0,16	0,14	0,073	0,055	—
Bouillaud	0	0,87	—	0,53	0,30	0,83
Bouillaud	0	0,95	0,92	0,78	0,13	0,91
Normale	0	0,63	0,70	0,51	0,19	0,70
Normale	0	0,58	0,58	0,45	0,07	0,52
Normale	0	0,43	0,43	0,37	0,06	0,43
Normale	0	0,45	0,45	0,37	0,07	0,44
	0	0,27	—	0,21	0,06	0,27
	0	0,87	—	0,72	0,15	0,87
Normale	0	0,39	—	0,23	0,14	0,37
Néphrite	0,8	0,30	0,30	0,26	0,05	0,31
Syphilis	0	0,50	—	0,41	0,08	0,49
Diabète	0	0,52	0,51	0,47	0,04	0,51

On opérera en général sur 1 cm³ d'urine soit 2 cm³ de filtrat trichloracétique ou 5 cm³ de filtrat tungstique ; le dosage sera fait avec SO₄H N/140 dont chaque cm³ correspond à 0,1 mg. d'azote.

Le tableau XXII montre qu'en additionnant l'azote ammoniacal et l'azote aminé obtenus par cette méthode, on obtient aux erreurs d'expérience près le taux d'azote donné par la méthode au formol.

Il est donc possible, par cette méthode, de dissocier dans l'azote formol la part qui revient respectivement à l'azote aminé et à l'azote ammoniacal. Cette dissociation prend une importance particulière lorsqu'il s'agit, notamment avec un taux d'azote formol élevé, de savoir s'il s'agit d'une acidose (élévation des sels ammoniacaux) ou d'une excrétion urinaire exagérée d'azote aminé. Pour ces raisons, la possibilité d'effectuer les deux déterminations sur un même échantillon d'urines nous paraît susceptible de rendre service en clinique.

CONCLUSIONS

I. — La désamination hydrolytique des acides aminés par l'acide nitreux est une réaction monomoléculaire irréversible. Le calcul de la constante de vitesse permet de constater que la désamination est d'autant plus rapide que la molécule d'acide aminé a un caractère acide plus marqué ; ce caractère acide est généralement objectivé par la constante de dissociation du carboxyle. Cette méthode de désamination n'est pas spécifique des acides α -aminés. En particulier, les groupements aminés en position autre que α par rapport au carboxyle sont également attaqués par l'acide nitreux mais la réaction est plus lente. De plus, les liaisons peptidiques peuvent être plus ou moins complètement hydrolysées par ce réactif.

II. — Nous avons montré un effet curieux des halogènes sur la désamination par l'acide nitreux. Il y a toujours accélération de la réaction en présence de brome ou d'iode. En particulier, les vitesses de désamination des acides aminés aromatiques halogénés (tyrosine mono et dibromée, mono et diiodée ; histidine mono et diiodée) sont toujours plus grandes que celles des mêmes acides aminés non halogénés.

III. — La désamination oxydative des amino acides, telle qu'elle est réalisée par une solution alcaline de permanganate de potassium est trop brutale pour permettre de noter des différences nettes dans le comportement individuel des acides aminés. La méthode qui est peu spécifique donne des résultats très irréguliers.

IV. — La chloramine T en milieu alcalin et la ninhydrine en milieu acide réalisent à la fois la désamination et la décarboxylation des amino-acides, la décarboxylation étant la condition de la désamination.

a) La chloramine T se prête particulièrement bien à une étude cinétique de la désamination, la réaction n'étant en général complète qu'en 15 minutes aux températures utilisées (50 et 70°). Cette étude fait ressortir une opposition nette entre le comportement des amino-acides avec la chloramine et avec l'acide nitreux. C'est, en effet, surtout la constante de dissociation du groupement NH^2 qui règle la vitesse de l'action de la chloramine.

b) La même étude cinétique effectuée avec la ninhydrine nécessitant la température de 100° fait moins apparaître de différences individuelles dans le comportement des acides aminés.

V. — La chloramine T, comme la ninhydrine sont suffisamment spécifiques des composés α -aminés. Nous avons directement montré leur inactivité vis-à-vis de composés azotés divers d'intérêt biologique ou faisant partie de l'azote non protéique du sang.

VI. — Étant donné les concentrations moyennes des principaux acides aminés dans le plasma sanguin, nous avons montré qu'à ces concentrations, les deux méthodes (chloramine et ninhydrine) donnent de bons résultats que ce soit en solution pure ou en présence de désalbuminant (acide trichloracétique, phosphotungstique, et tungstique).

VII. — L'étude comparative de la chloramine et de la ninhydrine en vue d'application aux milieux biologiques fait ressortir les faits suivants :

a) Le pouvoir hydrolysant vis-à-vis des oligopeptides est plus faible avec la chloramine qu'avec la ninhydrine.

b) Lorsqu'on dose sur un même filtrat de désalbumination, l'azote aminé du plasma par la chloramine et la ninhydrine, le résultat le plus faible (donc le meilleur parce que le plus spécifique) est obtenu avec la chloramine.

c) La réalisation pratique de la méthode de désamination à la chloramine est de beaucoup la plus simple.

VIII. — C'est donc la désamination par la chloramine T qui nous paraît la plus adaptée à l'étude de l'azote aminé des milieux biologiques après désalbumination tungstique.

De plus, cette technique permet dans le cas de l'urine de doser sur un même échantillon l'azote ammoniacal et l'azote aminé.

BIBLIOGRAPHIE

- CRISTOL (Paul), BÉNÉZECH (C.), LISSITZKY (S.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 150.
- FROMAGEOT (C.) et HEITZ (P.). — *Enzymologia*, 1939, 6, 258 cité d'après Adv. in Prot. Chemistry, Vol. II, p. 48.
- DUNN (M.S.) et SCHMIDT (C.L.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1922, 53, 401.
- POLONOVSKI (M.), BOULANGER (P.) et OUDAR. (Cl.) — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 2, 605.
- WILSON (D.W.). — *J. Biol. Chem.*, 1923, 56, 183.
- BUSSI (L.) et CACCIANOTI (S.). — *Minerva Med.* 1947, 38, 221.
- LANGHELD (K.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1909, 42, 2360.
- POLONOVSKI (M.). — *J. Pharm. Belg.*, 1939, n° 3 à 9.
- POLONOVSKI (M.). — *X^e Congresso Internazionale di chimica*, Rome, 1938, vol. V, 163.
- VAN SLYKE (D.D.), DILLON (R.T.), Mc FADYEN (D.A.) et HAMILTON (P.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 627.
- DAKIN (H.D.) et DUNHAM (E.K.). — *Manuel des Antiseptiques*. Vigot, éd. Paris 1918.
- YOVANOVITCH (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, 7, 665.
- Mc FADYEN (D.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, 153, 507.
- RUHEMAN . — *J. Chem. Soc.*, 1911, 99, 792, 1306, 1486.
- MEEKER et WAGNER (E.C.). — *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1933, 5, 396, Cité par VAN SLYKE (D.D.), HILLER (A.) et Mc FADYEN (D.A.), in *J. Biol. Chem.*, 1941, 681.
- VAN SLYKE (D.D.), Mc FADYEN (D.A.) et HAMILTON (P.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, 141, 671.
- GRASSMANN et VON ARNIM. — *J. Ann. Chem. Soc.*, 1934, 510, 288.
- PETERS (J.P.) et VAN SLYKE (D.D.). — *Quantitative Chemical Chemistry, Methods*, London, 1932.
- HERKEN (H.) et SCHUNK (Y.). — *Zeitschr. Exper. Med. Grenzgebiet.* 1948, 3, 729.
- FOLIN (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1922, 51, 377 et 1922, 51, 393.
- FRAME, RUSSEL (J.) et WICHELM (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1945, 149, 255.
- KREBS (HA.). — *Chemical Composition of blood plasma and serum. Ann. Rev. of Biochem.*, 1950, 19, 409.
- HAMILTON (P.B.) et VAN SLYKE (D.D.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, 150, 231.
- GUTMAN (G.E.) et ALEXANDER (B.). — *J. Biol. Chem.* 1947, 158, 527.
- SOBEL (A.E.), HIRSCHMAN (A.) et BESMAN (L.). — *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 99.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
CHAP. I. — DÉSAMINATION HYDROLYTIQUE PAR L'ACIDE NITREUX	13
A. — Conditions expérimentales	
B. — Étude cinétique de la réaction	
C. — Action des halogènes sur la désamination par l'acide nitreux	
CHAP. II. — DÉSAMINATION PAR LE PERMANGANATE DE POTASSIUM	24
CHAP. III. — DÉSAMINATION PAR LA CHLORAMINE T	26
A. — Action générale de la chloramine T sur les acides aminés	
B. — Étude cinétique de la réaction	
CHAP. IV. — DÉSAMINATION PAR LA NINHYDRINE	39
A. — Mode d'action de la ninhydrine sur les acides α -aminés	
B. — Détermination de la constante de vitesse	
C. — Comportement individuel des acides aminés au cours de la réaction	
CHAP. V. — COMPARAISON ENTRE LES DIFFÉRENTS MODES DE DÉSAMINATION ÉTUDIÉS	44
A. — Précisions des différentes méthodes utilisées	
B. — Spécificité	
CHAP. VI. — APPLICATION DE LA DÉSAMINATION PAR LA CHLORAMINE T ET LA NINHYDRINE AUX MILIEUX BIOLOGIQUES	50
A. — Influence de la concentration en azote aminé	
B. — Désamination des acides aminés en solution, en présence d'un désalbuminant	
C. — Désamination par la chloramine T et la ninhydrine et teneur du plasma en acides aminés	
D. — Choix d'une technique de dosage de l'azote aminé du plasma	
E. — Application de la désamination par la chloramine T à l'étude des urines	
CONCLUSIONS	67

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers Condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

En ma qualité de Censeur de tour,
j'ai lu la Thèse ayant pour titre :

**Recherches sur les Désaminations des
Acides Aminés. Etude Chimique.
Application aux dosages dans les
milieux Biologiques.**

par M. Pierre CRISTOL.

Je pense que la Faculté peut en
permettre l'impression :

Montpellier, le 3 Juillet 1952.

Le Professeur,
L. HÉDON.

Vu :
Montpellier, le 8 Juillet 1952.

Le Doyen,
G. GIRAUD.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 12 Juillet 1952.

Le Recteur :
GUILLON.

La Faculté de médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur ; qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

C A U S S E
G R A I L L E
C A S T E L N A U
— I M P R I M E U R S —
M O N T P E L L I E R
